ISSN 2186-7976

March 5, 2018
平成３０年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2018

大会講演要旨集

■２０１８年度(平成３０年度)大会[名古屋]■



公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------8
一般講演プログラム----------9
一般講演要旨----------82
大会シンポジウムプログラム----------1,959
大会シンポジウム要旨----------1,969
学術活動強化委員会企画シンポジウムプログラム----------2,130
学術活動強化委員会企画シンポジウム要旨----------2,131
産学官学術交流委員会企画シンポジウムプログラム----------2,143
産学官学術交流委員会企画シンポジウム要旨----------2,144
ランチョンシンポジウムプログラム----------2,145
ランチョンシンポジウム要旨----------2,147
ランチョンセミナープログラム----------2,151
ランチョンセミナー広告要旨----------2,153

日本農芸化学会

（2018 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2018 年 3 月 15 日(木)　9 時 00 分～16 時 30 分（受付 8 時 30 分～）
場　所：ホテルナゴヤキャッスル（名古屋市西区樋の口町 3 番 19 号）
進行予定：

（9:00）**2018 年度学会賞等授賞式**　　2 階「青雲の間」
　　1　授賞選考委員長報告
　　2　日本農芸化学会賞授与
　　3　日本農芸化学会功績賞授与
　　4　農芸化学技術賞授与
　　5　農芸化学奨励賞授与
（9:20）**農芸化学女性研究者賞等授賞式**
　　1　農芸化学女性研究者賞等授賞選考委員長報告
　　2　農芸化学女性研究者賞授与
　　3　農芸化学若手女性研究者賞授与
　　4　農芸化学女性企業研究者賞授与
（9:30）**第 15 回農芸化学研究企画賞表彰式**
　　1　産学官学術交流委員長報告
　　2　農芸化学研究企画賞表彰
（9:35）**BBB 論文賞，BBB Most-Cited Paper Award 及び BBB Most-Cited Review Award 表彰式**
　　1　英文誌編集委員長報告
（9:40）**会長祝辞**
（9:45）＊＊＊＊＊＊　休憩 15 分間　＊＊＊＊＊＊
（10:00）**受賞者講演開始**
（10:00）日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 30 分）
（11:00）日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 30 分）
（12:00）＊＊＊＊＊＊　休憩 60 分間　＊＊＊＊＊＊
（13:00）農芸化学技術賞受賞者講演　（3 件，各 15 分）
（13:45）農芸化学奨励賞受賞者講演　前半（5 件，各 14 分 +1 分）
（15:00）＊＊＊＊＊＊　休憩 15 分間　＊＊＊＊＊＊
（15:15）農芸化学奨励賞受賞者講演　後半（5 件，各 14 分 +1 分）
（16:30）**受賞講演終了**
（17:00～18:00）**農芸化学「化学と生物」シンポジウム**　同会場
（18:30～20:30）**懇親会**　2 階「天守の間」

農芸化学女性研究者賞等受賞講演
日　時：2018 年 3 月 16 日（金）14:00～16:35
会　場：名城大学 B04 会場（共通講義棟南 2 階 S201 教室）
次　第：
（14:00）開催の辞
　　会長挨拶
（14:05）農芸化学女性研究者賞受賞講演（3 件，各 15 分）
（14:50）農芸化学若手女性研究者賞受賞講演（3 件，各 15 分）
（15:35）＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
（15:45）農芸化学女性企業研究者賞受賞講演（3 件，各 15 分）
（16:30）閉会の辞

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

石野　良純　（九州大学大学院農学研究院）
「原核微生物の生命機能メカニズムに関する研究～バクテリアからアーキアへ～」

五味　勝也　（東北大学大学院農学研究科）
「麹菌における有用遺伝子の発現制御機構の解明とその応用研究」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件 50 音順）

井本　正哉　（慶應義塾大学理工学部）
「がん細胞の特性を標的とする阻害剤の化学生物学的研究」

裏出　令子　（京都大学大学院 農学研究科）
「タンパク質の新機能性開発に関する多面的基盤研究」

【農芸化学技術賞】（4 件，50 音順）

蛸井　　潔・糸賀　　裕・岡田　行夫・鯉江弘一朗（サッポロビール株式会社）
「ホップ品質の多角的な解析とその応用」

堀江　健二・渡部　和哉・山津　敦史・坂下　真耶（株式会社ファーマフーズ）
「GABA の生産技術の確立と高機能食品の市場開発」

宇多川　隆・白崎　裕嗣・森山外志夫・片口　敏昭（福井県食品加工研究所・株式会社 室次・有限会社 もりやま・有限会社 片口屋）
「地域資源を活かした速醸新魚醤類の開発と商品化」

【農芸化学奨励賞受賞】（10 件，50 音順）

伊原　　誠　（近畿大学農学部）
「イオンチャネル内蔵型受容体の高選択的リガンド認識と機能調節に関する生物有機化学研究」

小笠原泰志　（北海道大学大学院工学研究院）
「ペプチドの構造に多様性を与える新規酵素の探索」

梶川　昌孝　（京都大学大学院生命科学研究科）
「藻類での有用脂質生産と脂質蓄積制御因子の同定」

勝山　陽平　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「放線菌のもつ多様な二次代謝産物生合成機構の解析」

加藤　英介　（北海道大学大学院農学研究院）
「食用植物の抗肥満，抗糖尿病効果を分子レベルで理解するための生物活性成分の探索と機能解析」

後藤　　剛　（京都大学大学院農学研究科）
「エネルギー代謝を制御する食品成分とその作用機構に関する研究」

辻村　清也　（筑波大学数理物質系）
「バイオエレクトロカタリシスの基礎と応用の新展開」

豊福　雅典　（筑波大学生命環境系）
「低分子化合物及び膜小胞を介した細菌間相互作用に関する研究」

原田　直樹　（大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科）
「生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の相互作用に関する研究」

若井　　暁　（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）
「極限環境微生物のエネルギー変換に関する生化学および熱力学的解析」

【農芸化学女性研究者賞】（3 件，50 音順）

大田ゆかり　（国立研究開発法人海洋研究開発機構）
「海洋微生物からの有用機能の探索とその応用」

古園さおり　（東京大学生物生産工学研究センター）
「細菌の環境応答と適応に関する分子生物学的研究」

齊藤安貴子　（大阪電気通信大学工学部）
「有機合成を基軸としたフラバン–3–オール誘導体の機能性解明研究と栽培現場への貢献を目指した研究展開」

【農芸化学若手女性研究者賞】（3 件，50 音順）

梅川　碧里　（京都大学大学院生命科学研究科）
「微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用」

戸田　安香　（明治大学農学部）
「味覚受容体の新しい機能解析技術の開発と味覚受容の分子機構の解明」

山下　陽子　（神戸大学大学院農学研究科）
「プロシアニジンの高血糖・肥満予防効果に関する研究」

【農芸化学女性企業研究者賞】（3 件，50 音順）

石本　容子　（第一三共株式会社）
「血管成熟化促進作用を持つ新規天然物 vestaine の同定」

堤　　浩子　（月桂冠株式会社　総合研究所）
「清酒副産物の機能性ペプチドに関する研究」

松井　知子　（ノボザイムズ ジャパン株式会社 研究開発部門）
「タンパク質工学を利用した産業用酵素の開発」

【第 15 回農芸化学研究企画賞受賞者】（2 件）

研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発

⑴ 革新的医薬医療を志向した生物活性物質の探索・合成・生産等の研究と新技術開発
⑵ 革新的農林水産物生産を志向した生物活性物質研究と新技術開発

高谷　智英　（信州大学農学部）
「筋分化を誘導する乳酸菌オリゴ DNA の生体内作用の実証」

研究領域③　グリーンバイオテクノロジー

⑴ バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー
⑵ 省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
⑶ 環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー

春田　　伸　（首都大学東京理工学研究科）
「セルロースナノファイバー生産のための温泉微生物生態系エンジニアリング」

【平成 30 年度日本農学賞受賞者】（本会推薦）

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.

2018 年 4 月 5 日東京大学弥生講堂で開催される日本農学大会において，日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています.

受 賞 者：山本(前田)万里（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門 食品健康機能研究領域長）
受賞題目：緑茶の生理機能の解明とその応用に関する研究

【2017年（Vol.81）B.B.B. 論文賞（掲載順）】（12件）

pp.102～111 Katsutoshi Nishino, Misao Shiro, Ryuki Okura, Kazuya Oizumi, Toru Fujita, Takahiro Sasamori, Norihiro Tokitoh, Akiyoshi Yamada, Chihiro Tanaka, Muneyoshi Yamaguchi, Syuntaro Hiradate & Nobuhiro Hirai
The (oxalato) aluminate complex as an antimicrobial substance protecting the "shiro" of *Tricholoma matsutake* from soil micro-organisms

pp.147～152 Naoki Yokotani, Misugi Uraji, Miyuki Hara, Seisuke Hihara, Tadashi Hatanaka & Kenji Oda
Low accumulation of chlorogenic acids represses reddening during flesh browning in Japanese peach "Okayama PEH7"

pp.249～255 Yasuhiro Ishimaru, Takaya Oikawa, Takeshi Suzuki, Syohei Takeishi, Hideyuki Matsuura, Kosaku Takahashi, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi, Takafumi Shimizu, Mitsunori Seo, Hiroyuki Ohta & Minoru Ueda
GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*

pp.1136～1147 Ayaka Ichikawa Nagasato, Hiroshi Yamashita, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda & Noriyuki Kioka
The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in sensing stiffness of extracellular matrix

pp.1176～1184 Zhongfeng Ye, Kazuya Nakagawa, Masahiro Natsume, Hideaki Nojiri, Hiroshi Kawaide & Kazunori Okada
Biochemical synthesis of uniformly ^{13}C-labeled diterpene hydrocarbons and their bioconversion to diterpenoid phytoalexins *in planta*

pp.1444～1451 Kohei Nishino, Misaki Kushima, Tomohiro Kaino, Yasuhiro Matsuo & Makoto Kawamukai
Urea enhances cell lysis of *Schizosaccharomyces pombe ura4* mutants

pp.1470～1477 Kumi Otori, Masahiro Tamoi, Noriaki Tanabe & Shigeru Shigeoka
Enhancements in sucrose biosynthesis capacity affect shoot branching in *Arabidopsis*

pp.1598～1606 Ryo Nakamura, Kumiko Nakano, Hiroyasu Tamura, Masaki Mizunuma, Tohru Fushiki & Dai Hirata
Evaluation of the comprehensive palatability of Japanese sake paired with dishes by multiple regression analysis based on subdomains

pp.1837～1844 Keita Fukui, Kei Nanatani, Yoshihiko Hara, Suguru Yamakami, Daiki Yahagi, Akito Chinen, Mitsunori Tokura & Keietsu Abe
Escherichia coli yjjPB genes encode a succinate transporter important for succinate production

pp.2009～2017 Aina Gotoh, Misaki Nara, Yuta Sugiyama, Mikiyasu Sakanaka, Hiroyuki Yachi, Aya Kitakata, Akira Nakagawa, Hiromichi Minami, Shujiro Okuda, Toshihiko Katoh, Takane Katayama & Shin Kurihara
Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles

pp.2130～2138 Ayano Komine-Abe, Megumi Nagano-Shoji, Shosei Kubo, Hisashi Kawasaki, Minoru Yoshida, Makoto Nishiyama & Saori Kosono
Effect of lysine succinylation on the regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI, involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*

pp.2168～2177　Masayuki Shibata, Motohiko Hirotsuka, Yukiko Mizutani, Haruya Takahashi, Teruo Kawada, Kentaro Matsumiya, Yukako Hayashi & Yasuki Matsumura
Isolation and characterization of key contributors to the “kokumi” taste in soybean seeds

【Most-Cited Paper Award】被引用回数　20 回
Vol.79, No. 1, pp. 130～137
Ha-Young Park, Yuri Kunitake, Naoto Hirasaki, Mitsuru Tanaka & Toshiro Matsui
Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月１６日（金）

３ ⟶ ３月１７日（土）

次のアルファベットは建物記号、その次の数字二桁は、会場番号

Ａ　　共通講義棟北

Ｂ　　共通講義棟南

（例：Ｂ１０　→　共通講義棟南　Ｂ１０会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部

ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ０８ｐ１４**は、

３月１６日（金）、共通講義棟北Ａ０８会場、午後の部、１４番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

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

ｐ［ｐｍ］（午後）

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

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，11 分（発表 8 分，質疑 2 分 30 秒，交替時間 30 秒）.
2. ○は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長は，35〜37 ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2：3 月 16 日，3：3 月 17 日），2〜4 文字目は講演会場（A01〜B10），5 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前，p は午後，6〜7 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01〜20）.（例）「2A08p14」は，3 月 16 日，A08 会場，午後の部，14 番目の講演となります.

第 2 日（3 月 16 日）

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名（所属）

A01 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞 - 分離，分類，生態―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A01a01　新素材キチンナノファイバーを用いた選択的寄生菌分離法の確立
9:00　○岩﨑弘夢[1]，野中健一[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研）

2A01a02　コレステロール分解性あるいは吸収性をもつ真菌の探索
9:11　○小池　優[1]，橋床泰之[2]（[1]北海道大学農学部，[2]北海道大学大学院農学院）

2A01a03　高濃度二酸化炭素で良好に生育する Micractinium 属微細藻類の分類
9:22　○知名さきえ，藤井克彦（山口大農）

2A01a04　好熱好アルカリ性 Geobacillus toebii OIT60-9-2 株を宿主とするウイルス φIN1 の分離・性状解析
9:33　○渡邊恭伸[1]，大森勇門[1]，土居克実[2]，尾崎清和[3]，大島敏久[1]（[1]大阪工大工，[2]九州大農，[3]摂南大薬）

2A01a05　発酵現場より単離した乳酸球菌ファージ Q1 の特性およびゲノム解析
9:44　○山迫彩華[1]，サンソントトマスシリンシオン[2]，藤野泰寛[1,3]，土居克実[1,3]（[1]九大院・生資環，[2]シーナカリンウィロート大・理，[3]九大・農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A01a06　酵素を用いた D-アスパラギン酸高生産乳酸菌探索法の開発
10:05　○梶谷賢吾，高橋祥司，阿部勝正，解良芳夫（長岡技科大・生物）

2A01a07　Firmicutes 門細菌における新規な C30 カロテノイド生産株の探索
10:16　○小柳　喬[1]，眞岡孝至[2]，越野雅人[1]，持永彩花[1]，長尾美帆[1]，新藤一敏[3]，三沢典彦[4]（[1]石川県大・食品，[2]生産開発研，[3]日本女子大・家政，[4]石川県大・資源研）

2A01a08　ピルビン酸や 3 ヒドロキシ酪酸を産生するハロモナス菌の分離
10:27　○辻　彩花[1]，木地　翼[2]，半田　瞳[2]，東　慶直[1,2]（[1]近畿大学大学院生物理工学研究科，[2]近畿大学生物理工学部）

2A01a09　MALDI-TOF MS を用いたプロテオタイピングによる *Salmonella enterica* の血清型識別
10:38　○加藤晃代[1]，山本奈保美[1]，永井里美[1]，島　圭介[2]，秋山由美[3]，太田順司[4]，田村廣人[1]（[1]名城大農，[2]㈱島津製作所，[3]兵庫県立健康生活科学研究所，[4]一般財団法人日本食品分析センター）

2A01a10　微生物腐食対策のための金属腐食性 *Prolixibacter* 属細菌検出系の構築
10:49　○飯野隆夫[1]，伊藤公夫[2]，大熊盛也[1]（[1]理研BRC-JCM，[2]新日鐵住金）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A01a11　水田土壌より分離した微好気性鉄酸化細菌 *Ferrisolum kumadai* gen. nov., sp. nov.
11:10　カァリファアシュラフ[1,2]，中筋悠太[3]，坂　紀邦[4]，本庄弘樹[5]，浅川　晋[6]，○渡邉健史[6]（[1]サウジアラビア キング・ファイサル大，[2]エジプト ベニ・スエフ大，[3]イチビキ㈱，[4]愛知農総試，[5]愛知県立農業大学校，[6]名古屋大院生命農）

2A01a12　ゲノム情報に基づいた *Acetobacter* 属酢酸菌群の系統分類に関する一考察
11:21　○小林ゆかり[1]，石川森夫[1]，鈴木敏弘[1]，松谷峰之介[2]，新村梨恵[1]，矢吹　岳[1]，海野祥子[1]，志波　優[3]，松下一信[2]，貝沼（岡本）章子[1]（[1]東京農大・応生科・醸造，[2]山口大・創成科学，[3]東京農大・生命・分子微生物）

2A01a13　Draft genome and description of Novimethylophilus kurashikiensis gen. nov. sp. nov., a new lanthanide-dependent methylotrophic species of Methylophilaceae
11:32　○HAOXIN LYU，AKIO TANI（Okayama Univ.）

2A01a14　Methylobacterium aquaticum strain 22A におけるメタノール脱水素酵素遺伝子のランタノイド依存的制御
11:43　○平賀翔大，藤谷良子，谷　明生（岡山大植物研）

2A01a15　*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの機能解析
11:54　○春名優希[1]，加藤純一[2]（[1]岡山大植物研，[2]広島大院先端物質科学）

A01 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞 - 分離，分類，生態/その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A01p01　竹粉の田面施用が土壌の窒素固定活性に及ぼす影響
14:00　○嵐田　遥，平井英明，前田　勇（宇大農）

2A01p02　土壌環境の違いによる総細菌数，炭化水素分解菌，窒素固定菌，および Bacillus 属細菌の解析
14:11　○柴田　徹，嶋岡邦彦，荒木希和子，久保　幹（立命館大生命科）

2A01p03　新規細菌の分離源としてのササラダニ類の解析
14:22　○飯田敏也，工藤卓二，大熊盛也（理研BRC-JCM）

2A01p04　細胞性粘菌と土壌線虫における生物間コミュニケーションの解析
14:33　○齊藤佑美子[1]，宮崎早紀[1]，白神美菜子[1]，永松ゆきこ[2]，Bartlem Derek[3]，齊藤玉緒[4]（[1]上智大院・理工，[2]パネフリ工業株式会社，[3]北海道大・農，[4]上智大学・理工）

2A01p05　メタ 16S 解析による渡良瀬遊水地の環境細菌
14:44　○荒川理彩[1]，田口尚幸[1]，木川田喜一[1]，木村信忠[2]，斎藤玉緒[1]（[1]上智大・理工，[2]産総研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A01p06　循環型汚水浄化槽内のアミノ酸代謝系の解析とその関連細菌の推定
15:05　○日下みのり，増子幸佑，有見芳樹，鈴木智順（東理大 応生）

2A01p07　16S rDNA-RT-PCR-DGGE 解析を利用したモデル浄化槽における主要なタンパク質分解細菌の推定
15:16　○増子幸佑，島田紘帆，榊原健太，鈴木智順（東理大 応生）

2A01p08　米乳酸発酵食品における *Lactobacillus sakei* の生育特性の詳細解析
15:27　○鶴貝采映[1]，辻　篤史[2]，小柳　喬[1]（[1]石川県大，[2]石川県工試）

2A01p09　フルクトフィリック乳酸菌 *Leuconostoc citreum* F192-5 株の菌株特異的な環境適応に関する研究
15:38 ○前野慎太朗[1]，　梶川揚申[2]，　谷澤靖洋[3]，　兼崎　友[4]，久保田恵理[4]，中川純一[5]，有田正規[3,6]，ディックスレオン[7]，遠藤明仁[5]（[1]東農大生物産業学研究科，　[2]東農大応用生物科学，　[3]遺伝研生命情報センター，　[4]東農大生物資源ゲノム解析センター，　[5]東農大食品香粧学科，[6]理研環境資源科学研究センター，[7]ステレンボッシュ大学微生物学科）

2A01p10　*Zymomonas mobilis* の高温における細胞伸長の改善
15:49 ○遠藤　慧[1]，山賀　啓[2]，水木　徹[3]，三浦　健[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・応用生物，[3]東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A01p11　寒冷環境から分離された酵母の凍結耐性における小進化の可能性
16:10 ○森本一輝，小西正朗（北見工大）

2A01p12　椿山から分離した野生酵母の醸造適性分析
16:21 ○関　淑楓，工藤泰良，山本　歩（八戸高専）

2A01p13　異質 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* は異質 1 倍体配偶子を作ることができるのか？
16:32 ○渡部　潤[1]，茂木亮介[1]，上原健二[2]，月岡祐一郎[1]（[1]ヤマサ醤油，[2]秋田総食研セ）

2A01p14　ジグリセリンジカプリル酸エステルが *Candida albicans* に及ぼす影響
16:43 ○小出知次郎[1]，田村宗明[2]（[1]理研ビタミン株式会社，[2]日本大学歯学部）

2A01p15　溶菌法による酵母への迅速なプラスミド導入系の開発
16:54 ○金子真也[1]，中濱みさ子[1]，福島寛美[2]，板谷光泰[3]（[1]東工大・生命理工，[2]TRAHED，[3]慶應大・先端生命研）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A01p16　光触媒反応による真菌胞子へのダメージに与える胞子色素の影響
17:15 ○梶原雄太郎[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研）

2A01p17　細菌のペプチドグリカン層に対する光触媒反応の影響
17:26 ○髙尾綾乃[1]，大嶋佑治[1]，岡本歩未[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大　応生，[2]東理大　総研）

2A01p18　生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond（BDD）電極併用汚水浄化システムの構築と評価
17:37 ○井手口真理[1,3]，　佐藤俊貴[1]，　落合　剛[2,3]，　藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[2,3]（[1]東理大　応生，[2]東理大　総研，[3]KISTEC）

2A01p19　エタノールと光触媒により生成した有機過酸化物による芽胞菌死滅の機構解明
17:48 ○石岡　瞬[1,2]，　山口友一[1,2]，　佐久間貴大[2]，　勝又健一[1]，寺島千晶[1]，藤嶋　昭[1]，鈴木智順[1,2]，大和屋健二[2]，中田一弥[1,2]（[1]総合研究院　光触媒国際研究センター，[2]東京理科大学）

2A01p20　簡便なペクチン分解活性評価法に関する研究
17:59 ○石原真以[1]，吉川真広[2]，清水一憲[2]，鈴木宏昭[1]，本多裕之[2,3]（[1]トヨタ紡織㈱，[2]名大院工，[3]名大・予防早期医療創生セ）

A02 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A02a01　食品微生物検査へのジェランガム培地適用の検討
9:00 ○細井知弘，佐藤万里（東京都立食技セ）

2A02a02　北海道東沖海底堆積物より取得した低温性微生物の解析
9:11 ○田島誉久[1]，鴨木明子[1]，小西正朗[2]，八久保晶弘[2]，坂上寛敏[2]，南　尚嗣[2]，山下　聡[2]，中島田豊[1]，加藤純一[1]（[1]広島大院先端，[2]北見工業大工）

2A02a03　カルチャーコレクションに眠っている金属腐食性微生物の探索
9:22 ○若井　暁[1]，飯野隆夫[2]，伊藤　隆[2]，大熊盛也[2]（[1]神戸大院イノベ，[2]理研 BRC-JCM）

2A02a04　スクロース構造類似二糖による腸内細菌の増殖
9:33 ○保坂浩貴[1]，平野菜摘[2]，平野貴子[1,2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

2A02a05　ハチミツに含まれるオリゴ糖のビフィズス菌による資化性
9:44 ○大坪和香子，澤田侑希，北澤春樹，齋藤忠夫（東北大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A02a06　亜リン酸を利用したシアノバクテリアの新規生物学的封じ込め手法の開発
10:05 ○本村　圭[1,2]，　廣田隆一[1,2]，　佐野公亮[1]，　神原亮大[1]，桂浦善一朗[1]，堀川凌平[1]，渡辺　智[2,3]，池田　丈[1]，石田丈典[1]，舟橋久景[1]，黒田章夫[1,2]（[1]広島大院・先端物質，[2]JST-ALCA，[3]東京農大・生命科学）

2A02a07　発芽能のある大豆は納豆菌の増殖を抑制する
10:16 ○杉浦春香[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]（[1]京大院・農，[2]摂南大・理工）

2A02a08　永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析
10:27 ○安岡　甫[1]，平山　彩[1]，紅谷貴之[2]，中田訓浩[3]，松村由信[1,3]（[1]関西大・生命生物工，　[2]関大院・生命生物工，　[3]関西大・ORDIST）

2A02a09　好気性従属栄養細菌株由来の極貧栄養環境での生育能を獲得した突然変異株の解析
10:38 ○稲葉慎之介，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大学・大学院生命科学研究科）

2A02a10　ニキビ患者群に多いアクネ菌株に対して選択的抗菌活性を示す脂肪酸のスクリーニング
10:49 宇山彩香[2]，杉野哲造[2]，田中重光[1]，○永尾寿浩[1]（[1]大阪技術研，[2]桃谷順天館）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A02a11　アルカン/培地二相培養系における *Rhodococcus erythropolis* PR4 の細胞局在性と酸素消費について
11:10 ○田淵大樹[1]，瀧原速仁[2]，岩淵範之[1]，砂入道夫[1]（[1]日本大学，[2]新潟大学）

2A02a12　窒素およびリン欠乏下での *Nannochloropsis* 属微細藻類の油生産と抽出した油試料中の脂肪酸組成
11:21 ○桑原　僚，滝口泰之（千葉工大工）

2A02a13　葉面 C1 微生物 *Methylobacterium* sp. OR01 株が葉面で利用可能なパントテン酸合成前駆体化合物の同定
11:32 吉田裕介[1]，○由里本博也[1]，井口博之[2]，阪井康能[1]（[1]京大院農，[2]京都学園大バイオ環境）

2A02a14　*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
11:43 ○松岡友洋，吉田信行（静大院・総合科技）

2A02a15　緑膿菌の cbb_3 型シトクロム *c* 酸化酵素の機能解析
11:54 ○木戸玲子，石井正治，新井博之（東大院・農生科）

A02 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A02p01　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 が産生する硫黄粒子について
14:00 ○小倉一将，亀谷将史，新井博之，石井正治（東大院・農生科）

2A02p02　絶対独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 におけるアミノ酸取り込み
14:11 ○小林あずさ，金　克泰，亀谷将史，新井博之，石井正治（東大院・農生科）

2A02p03　L 型大腸菌が栄養型に復帰するときの形態変化に関する基礎的研究
14:22 ○藤田智也　（茨城県立医療大医セ）

2A02p04　大腸菌の熱耐性と加熱損傷菌発生における発育・回復培地および抗酸化系化合物の影響
14:33 ○和田彰啓[1]，　小池佳都子[2]，　冨井恵奈美[2]，　坂元　仁[2,3]，土戸哲明[2]，古田雅一[1,2,3]　([1]大阪府大院工，[2]大阪府大[21]科研，[3]大阪府大放研セ)

2A02p05　枯草菌胞子の発芽レセプター活性測定システムを用いた全アミノ酸の発芽誘発特性の評価
14:44 ○坂元　仁[1,2]，古田雅一[1,2,3]，土戸哲明[1]　([1]大阪府大[21]科研，[2]大阪府大放研セ，[3]大阪府大院工)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A02p06　プラスミド保持に伴う負荷を細菌はどう軽減化するのか？
15:05 ○河野　響，上田朋美，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭　（東大・生物工学セ）

2A02p07　*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株は汎用ベクターにも非感受性なのか？
15:16 ○上田朋美，河野　響，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭　（東大・生物工学セ）

2A02p08　細菌の増殖における核様体タンパク質の役割
15:27 ○田島玖美子[1]，山内えりか[2]，石浜　明[3]，山本兼由[1,2,3]　([1]法政大,生命，[2]法政大院,理工,生命，[3]マイクロナノテクセンター)

2A02p09　大腸菌細胞内に安定的に存在するレスポンスレギュレーターの増殖への寄与
15:38 ○三宅裕可里[1]，石浜　明[2]，山本兼由[1,2]　([1]法政大院理工・生命，[2]マイクロナノテクセンター)

2A02p10　枯草菌における(p)ppGpp に依存しないアミノ酸飢餓適応機構の解析
15:49 ○大坂夏木[1]，高田　啓[2]，多喜乃雄太[1]，兼崎　友[3]，渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1]，朝井　計[1]　([1]東京農大・院・バイオ，[2]立教大学・理・生命理，[3]東京農大・ゲノム解析セ)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A02p11　深海好圧性細菌 Shewanella violacea におけるペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析
16:10 ○根來将吾[1]，翠川雄斗[1]，加藤千明[2]，阿部文快[1]　([1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構)

2A02p12　清酒酵母のジペプチド輸送体の解析
16:21 ○北村憲司[1,2]，　中川奈南[2]　([1]広島大・自然科学研セ，　[2]広島大・工)

2A02p13　栄養増殖と胞子形成のいずれにも関わる遺伝子の取得と解析
16:32 ○三浦　悠，中村太郎　（大阪市大院理）

2A02p14　細胞内外のアスコルビン酸およびエリスロアスコルビン酸が出芽酵母 SOD1 欠損株に与える影響
16:43 小柳ゆかり，五十嵐香澄，○尼子克己　（仁愛大人間生活）

2A02p15　炭素源の変化や枯渇により誘導されるオートファジーの機能
16:54 ○岩間　亮，大隅良典　（東工大）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A02p16　出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
17:15 ○松崎浩明，藤原祐気，平島宗一郎，宮本昭弘，柳本敏彰，秦野琢之　（福山大生命工）

2A02p17　グルコース制限はスピンドルチェックポイント Mad1 の機能低下を引き起こす
17:26 ○田部卓磨，吉田直己，谷添万里子，川向　誠，松尾安浩（島根大学）

2A02p18　出芽酵母の寿命制御に関わる Ssg1 の機能解析
17:37 ○益村晃司[1]，竹内悠人[2]，小川貴史[2]，金井宗良[3]，久米一規[2]，水沼正樹[2]　([1]広島大・工，[2]広島大院・先端研，[3]酒総研)

2A02p19　出芽酵母における圧力適応機構の解明
17:48 ○望月貴博，阿部文快　（青山学院大理工）

2A02p20　出芽酵母トリプトファン輸送体 Tat2 における基質輸送活性とユビキチン依存性分解
17:59 ○石井凌賀，天野香織，野際佳奈，今村恵莉，望月貴博，阿部文快　（青山学院大理工）

A03 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A03a01　細胞表層構造に着目したカビ制御検討
9:00 ○西本光穂子[1]，田邊弘毅[2]，原　光志[3]，田中亮子[3]，阪井達哉[1]，井上滋登[3]，久保田浩美[2]，伊藤将嗣[1]　([1]花王㈱ハウスホールド研，[2]花王㈱安全性科学研，[3]花王㈱解析科学研)

2A03a02　分裂酵母の核サイズ制御機構の解析
9:11 ○中垣裕作[1]，水沼正樹[2]，久米一規[2]　([1]広島大・工，[2]広島大院・先端研)

2A03a03　出芽酵母細胞壁 β-1,6-グルカン合成関連タンパク質の相互作用の解析
9:22 ○難波聖人[1,2]，足立博之[1]，依田幸司[1]，鎌倉高志[2]，野田陽一[1]([1]東大院・農生工・応生工，[2]東理大・理工)

2A03a04　紡錘体微小管形成における 14 型キネシンファミリータンパク質の役割
9:33 ○湯川格史[1,2]，山田侑亮[1]，山内智瑛[1]，登田　隆[1,2]　([1]広島大・院先端研・分子生命，[2]広島大・健康長寿研究拠点)

2A03a05　分裂酵母の胞子細胞膜にみられる特徴的な陥入構造の形成に関わる F-BAR ドメインタンパク質 Pil2 の解析
9:44 ○箕面凪砂[1]，田原悠平[1,2]，宮田真人[1,2]，中村太郎[1]　([1]大阪市大・院理，[2]大阪市大複合先端研究機構)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A03a06　酵母における小胞体からミトコンドリアへのステロールの輸送機構
10:05 田　スチ[1]，太田明徳[2]，堀内裕之[1]，○福田良一[1]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応生化)

2A03a07　*Saccharomyces cerevisiae* における Sec14 ファミリータンパク質 Sfh1 によるホスファチジルセリンのオルガネラ間輸送機構の解析
10:16 ○水池　彩[1]，小林新吾[1]，堀内裕之[1]，太田明徳[2]，福田良一[1]([1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応生化)

2A03a08　*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* の Sec14 ファミリータンパク質の機能解析
10:27 ○渡邉夏仁，水池　彩，堀内裕之，福田良一　（東大院・農生科・応生工）

2A03a09　出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化における α-アレスチン Rod1 による認識とユビキチン化制御機構の解析
10:38 ○藤田翔貴，五味勝也，新谷尚弘　（東北大院農・生物産業創生）

2A03a10　細胞内で凝集塊を形成する Gmp タンパク質の挙動と分子機構の解析
10:49 ○寺島知里，大山拓朗，田淵光昭，田中直孝　（香川大農・応用生物）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A03a11　分裂酵母 PQ ループファミリー Stm1 の細胞内局在とアミノ酸輸送活性について
11:10　○上田大資, 津山愛美, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸　(愛媛大農)

2A03a12　液胞アミノ酸トランスポーター Avt4 の発現調節と N 末端親水性領域を介した活性調節について
11:21　○佐藤明香音, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 佐藤有美香, 石本晶也, 河田美幸, 関藤孝之　(愛媛大農)

2A03a13　分裂酵母シンタキシン 1 の局在変化に関わる遺伝子の大規模スクリーニング
11:32　○増田風子, 中村太郎　(大阪市大院理)

2A03a14　出芽酵母オートファジーにおける Ykt6 のオートファゴソームと液胞の融合への関与
11:43　○浦野真吾, 菊地のぞみ, 五味勝也, 新谷尚弘　(東北大院農・生物産業創成)

2A03a15　ミクロオートファジーを制御するユビキチン関連因子の探索
11:54　○中川沙良, 奥　公秀, 阪井康能　(京都大学)

A03 会場　午後の部(14:00〜17:05)

微生物―細胞 - 構造, オルガネラ, 小胞, 分泌, 細胞構成分子―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A03p01　分裂酵母における Rab ファミリー small GTPase Ypt2 の減数分裂特異的な局在機構の解析
14:00　○今田一姫[1,2], 中村太郎[2]　([1]鈴鹿高専, [2]大阪市大院理)

2A03p02　ERAD に必要なチオレドキシン由来の還元力伝達を担う小胞体膜タンパク質の解析
14:11　○田中絵里子[1], 寶関　淳[2,3], 阪井康能[1,3]　([1]京大院農, [2]京都学園大・バイオ環境, [3]京大・生理化学)

2A03p03　分泌タンパク質アグマチナーゼの分裂酵母における生理的役割の解析
14:22　石田麻里絵, 兼丸加也, 青木克幸, 田淵光昭, ○田中直孝　(香川大農・応用生物)

2A03p04　マグネシウムが *Lactobacillus* 属の細胞壁テイコ酸に与える影響
14:33　○宮下　誉, 田中尚人, 藤田信之, 志波　優　(東京農業大学)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A03p06　低温菌における機能性多価不飽和脂肪酸の細胞内局在の可視化
15:05　○川本　純, 徳永智久, 渡辺文太, 小川拓哉, 栗原達夫　(京大・化研)

2A03p07　低温菌 *Shewanella* sp. HM13 の膜小胞輸送による選択的タンパク質分泌に関与する遺伝子の探索
15:16　○釜阪紘平[1], チェンチェン[1], 横山文秋[1], 川本　純[1], 今井友也[2], 小川拓哉[1], 栗原達夫[1]　([1]京都大学化学研究所, [2]京都大学生存圏研究所)

2A03p08　低温菌 *Shewanella* sp. HM13 におけるベシクル分泌関連タンパク質の探索
15:27　○横山文秋[1], 川本　純[1], 陳　　晨[1], 今井友也[2], 栗原達夫[1]　([1]京大・化研, [2]京大・生存研)

2A03p09　Serratia marcescens ヘム捕捉タンパク質 HasA 分泌の分子機構の解明
15:38　○森川瑠美[1], 小出(吉田)静代[2], 山下純平[2], 高木大地[2], 辻　明彦[2,3], 大森謙司[4], 湯浅恵造[2,3]　([1]徳島大工, [2]徳島大院先端技術, [3]徳島大生物資源, [4]名大院創薬)

2A03p10　細菌の有機塩素系殺虫剤資化に必須な ABC トランスポーターホモログの機能解析
15:49　○佐藤緋奈子, 中鉢千尋, 佐藤優花里, 矢野大和, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二　(東北大・院生命科)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A03p11　微生物相互作用を制御しうる MV 生産機構の解析
16:10　○安田まり奈[1], 豊福雅典[2], 森永花菜[1], 尾花　望[2], 野村暢彦[2]　([1]筑波大院・生命環境科学研究科, [2]筑波大・生命環境系)

2A03p12　環境中に存在するメンブレンベシクルの解析
16:21　○鬼澤里奈[1], 豊福雅典[2], 森永花菜[1], 尾花　望[2], 野村暢彦[2]　([1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系)

2A03p13　バイオフィルムにおける膜小胞分泌誘発とカルジオリピン局在化
16:32　○塩田拓也[1], 田代陽介[1], 新谷政己[1], 二又裕之[1,2], 金原和秀[1]　([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン研)

2A03p14　細菌の膜小胞取り込みを促進する膜間隙異常
16:43　○高木航太郎[1], 長谷川雄将[1], 二又裕之[1,2], 田代陽介[1]　([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン研)

2A03p15　グリシンによる大腸菌メンブレンベシクル産生の増大とその特性解析
16:54　○平山　悟, 中尾龍馬　(感染研・細菌第一)

A04 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 情報伝達, 細胞応答, ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A04a01　キナクリンはヒト肺がん腫 A549 細胞において TNF-*α* および Fas リガンドに対する感受性を増強する
9:00　○原田美鈴, 森元今日子, 近藤哲也, 平松令子, 翁　侑史, 向　　亮, 松田伊世, 片岡孝夫　(京工繊大応生)

2A04a02　細胞接着因子 ICAM-1 の細胞内輸送に対するアシアチン酸の作用機序の解明
9:11　○馬場康輔, 平松令子, 片岡孝夫　(京都工芸繊維大学応用生物)

2A04a03　TNF-*α* により誘導される NF-κB シグナル伝達経路に対する 4-hydroxypanduratin A と isopanduratin A の作用機序の解析
9:22　○谷垣里穂[1], NGUYEN Thi Thanh Mai[2], NGUYEN Trung Nhan[2], DO Van Nhat Truong[2], 片岡孝夫[1]　([1]京都工芸繊維大学・応生, [2]ベトナム国家大学ホーチミン市校)

2A04a04　NMN の PC12 細胞におけるミトコンドリア機能亢進を介した酸化ストレスからの細胞保護効果
9:33　○伊藤章悟, 長井　薫　(甲子園大学)

2A04a05　ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価
9:44　○武田昌之[1], 桝田和彌[3], 梶川揚申[2], 横田健治[2], 五十君靜信[2]　([1]東農大院農, [2]東農大応生科, [3]昭和女生活科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A04a06　His-Asp リン酸リレー情報伝達機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節
10:05　○金丸京子, 平川拓実, 木村　真, 小林哲夫　(名大院生命農)

2A04a07　細胞性粘菌の種間を超えて保存されているポリケタイド合成酵素の発生過程における機能進化
10:16　○成田隆明[1], Pauline Schaap[2]　([1]上智大理工, [2]ダンディー大)

2A04a08　キチンオリゴ糖は CERK1 を介して気孔閉口を誘導する
10:27　○叶　文秀[1,2,3], 新屋友規[3], 木下俊則[2], 賀来華江[4], 渋谷直人[4], 村田芳行[3]　([1](独)日本学術振興会外国人特別研究員, [2]名古屋大学, [3]岡山大学, [4]明治大学)

2A04a09　葉面に棲息する *Methylobacterium* 属細菌における KaiC タンパク質の環境適応バランサー機能
10:38　○吉田裕介[1], 井口博之[2], 藤澤健斗[1], 由里本博也[1], 小山時隆[3], 阪井康能[1]　([1]京大院農, [2]京都学園大バイオ環境, [3]京大院理)

2A04a10　イネいもち病菌における推定カルシウムチャネル構成因子 Ehs1 の機能解析
10:49　○林　　平, 平岡輪子, 成川　恵, 荒添貴之, 鎌倉高志　(東理大院理工・応生)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A04a11　緑膿菌の DNA 含有膜小胞の産生に関与する遺伝子に関する研究
11:10　○高野　恵, 大桃惇也, 志村洋一郎, 福島　淳　(秋田県立大学・生物資源科学部・微生物機能)

2A04a12　大腸菌のアラニン要求変異株に由来する薬剤耐性菌の出現頻度に及ぼす影響評価
11:21　○橋本美優[1], 金　世怜[2], 安藤太助[1], 磯貝恵美子[1], 米山　裕[1]　([1]東北大農, [2]産総研)

2A04a13　サルモネラ菌における情報伝達クロスレギュレーションの体系的解析
11:32　○加藤明宣　(近大農)

2A04a14　細菌の熱耐性における Toxin-Antitoxin システムの機能
11:43　○益田時光[1], 坂本英莉花[2], 本城賢一[1], 宮本敬久[1]　([1]九大院農院, [2]九大農)

2A04a15　大腸菌 PBP1B と MreB の同時欠損による溶菌現象のメカニズムの解明
11:54　○松本紗代子, 松倉智史, 小坂智恵, 坂庭友子, 岩井伯隆, 和地正明　(東工大生命理工学院)

A04 会場　午後の部(14:00〜18:10)

微生物―細胞 - 情報伝達, 細胞応答, ストレス応答―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A04p01　*Pseudomonas* sp. C8 株による異属微生物に対する増殖抑制機構
14:00　○本荘雅宏[1], 鈴木研志[2], 西村朋香[3], 田代陽介[1], 二又裕之[1,4]　([1]静大院・総合科技, [2]静大院・自然科学教育部, [3]静大・工, [4]静大・グリーン研)

2A04p02　LEA ペプチド発現による大腸菌の非生物的ストレス耐性の向上
14:11　○池野慎也, パサックニシット　(九工大院生命体)

2A04p03　緑膿菌環境単離株における細胞間コミュニケーション能力の切替え
14:22　○須澤由希[1], 遠矢正城[2], 豊福雅典[3], 尾花　望[3], 木暮一啓[4], 野村暢彦[3]　([1]筑波大・生命環境, [2]筑波大院・生命環境, [3]筑波大・生命環境系, [4]東京大・大気海洋研)

2A04p04　*Paracoccus denitrificans* は細胞間情報伝達を介して自身の生息域を拡大させる
14:33　○森永花菜[1], 豊福雅典[2], Andrew S. Utada[2], 尾花　望[2], 野村暢彦[2]　([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科, [2]筑波大学・生命環境系)

2A04p05　*Synechocystis sp.* PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィルム形性を促進する c-di-GMP 合成酵素 Hik17 の機能解析
14:44　○石川　航[1], 中鉢千尋[1], 牧野恒平[2], 渥美　駿[1], 解良康太[1,2], 魚住信之[1,2]　([1]東北大工, [2]東北大院工)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A04p06　ピンク汚れ原因菌 *Methylobacterium populi* における Quorum Sensing を介したバイオフィルム形成機構の解析
15:05　○諸星知広[1], 茂呂亮汰[1], 謝　肖男[2], 池田　宰[1]　([1]宇大院工, [2]宇大バイオ)

2A04p07　*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルム形成が芽胞の形態や耐性に影響を与える
15:16　○加藤寛子[1], 横山佳奈[2], 尾花　望[3], 久保田浩美[2], 八城勢造[2], 永井　智[2], 野村暢彦[3]　([1]筑波大院・生命環境, [2]花王・安全性科学研, [3]筑波大・生命環境系)

2A04p08　舳倉島自然土壌から共分離された放線菌とミコール酸含有細菌の相互作用
15:27　○加藤愛美, 浅水俊平, 菅井佳宣, 尾仲宏康　(東大院農)

2A04p09　プラスミド RP4 保持に伴う *Pseudomonas putida* KT2440 株の fitness 低下メカニズムの解明
15:38　○渡辺菜月[1], 水口千穂[1], 兼崎　友[2], 岡田憲典[1], 野尻秀昭[1]　([1]東大・生物工学セ, [2]東農大・生物資源ゲノム解析セ)

2A04p10　IncP-7 群プラスミドの接合伝達成立における二価カチオンの作用機序の解析
15:49　○作田郁子[1], 水口千穂[1], 松井一泰[1], 高橋裕里香[2], 岡田憲典[1], 山根久和[3], 新谷政己[4], 野尻秀昭[1]　([1]東大・生物工学セ, [2]富山県大生工科・生工研セ, [3]帝京大・バイオ, [4]静大院・総合科技)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A04p11　*Stenotrophomonas maltophilia* のメタノール走性の解析
16:10　○古川卓磨, 渡邉祐子, 酒井保藏, 荷方稔之　(宇都宮大院工)

2A04p12　*Stenotrophomonas maltophilia* のリン酸走性センサーの解析
16:21　○柳沢　優, 酒井保藏, 荷方稔之　(宇都宮大院工)

2A04p13　大腸菌 YgiT antitoxin による運動性およびバイオフィルム形成促進に関与する遺伝子の探索
16:32　○横井亮磨[1], 山口良弘[1,2]　([1]大阪市大院理, [2]大阪市大複合先端)

2A04p14　シアノバクテリア *Synechococcus elongatus*PCC 7942 における DNA 複製とリン酸代謝間の相互作用解析
16:43　辻出亘寛[1], 大林龍胆[2], 吉川博文[1], 廣田隆一[3], ○渡辺　智[1]　([1]東京農大生命, [2]遺伝研, [3]広島大先端)

2A04p15　DNA 傷害ストレスにより誘導されるシアノバクテリア SSB タンパク質の局在化に関する研究
16:54　○栗原亜実[1], 大林龍胆[2], 吉川博文[1], 渡辺　智[1]　([1]東京農大院バイオ, [2]遺伝研)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A04p16　シアノバクテリアの DnaJ(Hsp40)/J タンパク質の多彩な機能―DnaK(Hsp70)と HtpG(Hsp90)との相互作用について
17:15　○仲本　準　(埼玉大院理工)

2A04p17　水溶性アスタキサンチン結合タンパク質による微細藻類の光酸化ストレス防御機構
17:26　○豊島拓樹[1], 吉田梨沙子[1], 小飯田えり[1], 山崎敬太[1], 小俣　翼[1], 宮田彩実[1], 大島一輝[1], 金子隆之[1], 宮崎貴章[1], 石毛太一郎[2], 久保田恵理[2], 高市真一[3], 川崎信治[1]　([1]東農大バイオ, [2]東農大ゲノムセンター, [3]東農大微生物)

2A04p18　リボソームと細胞内 Mg^{2+} 濃度の相関性
17:37　○赤沼元気, 並木　晃, 山崎晃太郎, 矢岸勇真, 河村富士夫, 山田康之　(立教大・理・生命)

2A04p19　枯草菌 168 株が挿入配列を持たない理由の解明
17:48　○徳山麻里[1], 吉川博文[1], 朝井　計[1], 原田翔太[1], 兼崎　友[2]　([1]東京農大院バイオ, [2]東京農大ゲノム解析セ)

2A04p20　枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析
17:59　○松岡　聡[1], 篠原嵩人[1], 朝井　計[2], 戸澤　譲[1]　([1]埼玉大・理工研, [2]東京農大・バイオ)

A05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A05a01　Analysis of AoFus3 and its interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae*
9:00　○Taoning MO[1], Takuya KATAYAMA[1], Ozgur BAYRAM[2], Daigo TAKEMOTO[3], Gerhard H. BRAUS[4], Katsuhiko KITAMOTO[5], Jun-ichi MARUYAMA[1]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Gottingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.）

2A05a02　*Aspergillus* 属糸状菌の異なる分化における新規転写因子による制御機構の解析
9:11　○藤井陽平[1]，中村英淳[1]，片山琢也[1]，KARAHODA Betim[2]，BAYRAM Ozgur[2]，小川真弘[3]，小山泰二[3]，北本勝ひこ[4]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]アイルランド国立大学，[3]野田産研，[4]日薬大・薬）

2A05a03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の不和合性における HET ドメインタンパク質をコードする遺伝子の機能解析
9:22　○森　法子[1]，片山琢也[1]，齊藤亮太[2]，岩下和裕[2]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]酒総研）

2A05a04　イネいもち病菌の雌性不稔化の原因因子の探索と交配型決定領域の機能解析
9:33　○藤ヶ崎礼夏，小西高裕，荒添貴之，鎌倉高志（東理大院理工・応生）

2A05a05　Localization-based screening identified novel proteins regulating cell-to-cell communication in filamentous fungi
9:44　○Md. Abdulla Al MAMUN[1], Takuya KATAYAMA[1], Wei CAO[2], Shugo NAKAMURA[2], Jun-ichi MARUYAMA[1]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]INIAD, Toyo Univ.）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A05a06　アカパンカビ NER 関連遺伝子欠損株における光回復能の解析
10:05　○塚田耕太郎，一石昭彦（東洋大 生命科学）

2A05a07　糸状菌におけるミトコンドリア局在性 Superoxide dismutase（Mn-SOD）の機能的役割
10:16　○前田祐未子，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）

2A05a08　糸状菌分泌型ホスホリパーゼ A_2（PLA_2）の持つ PLA_1 活性と生理機能の解析
10:27　○笹原大志[1]，宮川拓也[2]，大塚　淳[2]，吉野龍ノ介[1]，寺田　透[1,3]，田之倉優[2]，有岡　学[1]（[1]東大院　農生科　応生工，[2]東大院　農生科　応生化，[3]東大院　農生科　アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット）

2A05a09　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析
10:38　○片桐珠希，竹内道雄，山形洋平（東京農工大農・応生化）

2A05a10　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるアクティベーションタグを用いた遺伝子機能解析法の開発
10:49　○森　絢美[1]，井上　樹[2]，松岡太郎[1]，徳岡昌文[2]，進藤　斉[2]，穂坂　賢[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A05a11　ゲノム編集時に引き起こされる麹菌 *Aspergillus oryzae* の大規模欠失機構に関する研究
11:10　○水谷　治[1]，林　梨咲[2]，渡嘉敷直杏[1]，上里優希[1]，上元　優[1]，玉井萌子[1]，荒添貴之[3]，山田　修[2]，外山博英[1]（[1]琉球大農，[2]酒総研，[3]東京理科大理工）

2A05a12　分裂酵母における胞子成熟に関わる遺伝子の取得と解析
11:21　○張　博文，増田風子，中村太郎（大阪市大院理）

2A05a13　分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に必須な機能未知のタンパク質 Spo45 の解析
11:32　○新美柊子，中村太郎（大阪市大院理）

2A05a14　分裂酵母胞子の最外タンパク質層構築に関連する因子の同定と解析
11:43　○酒井崇史[1]，田原悠平[1,2]，宮田真人[1,2]，中村太郎[1]（[1]大阪市大院理，[2]大阪市大複合先端研究機構）

2A05a15　超好熱性アーキアの硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の同定
11:54　○秀瀬涼太，榊原早津季，藤原伸介（関学大院理工）

A05 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―遺伝子 - 構造，機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A05p01　超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* におけるキチナーゼ遺伝子破壊株の解析
14:00　○山田将大，中田菜月，MEHWISH Aslam，金井　保，跡見晴幸（京大院工）

2A05p02　*Sphingobium* sp.SYK-6 株における鉄取り込みに関与する遺伝子の同定
14:11　○佐久本太一，藤田雅也，森　光佑，于　宏洋，上村直史，政井英司（長岡技科大・生物）

2A05p03　リグニン由来アセトフェノン誘導体に作用する多成分カルボキシラーゼシステム
14:22　○竹浪寛樹，樋口雄大，上村直史，政井英司（長岡技科大工）

2A05p04　染色体パッセンジャー複合体は環状染色体の維持に必要である
14:33　○上野　勝，ハビブアハメド（広大）

2A05p05　*Thermococcus kodakarensis* の複製フォーク進行および修復を担う 2 つの Cdc45/RecJ
14:44　○永田麻梨子[1]，石野園子[1]，山上　健[1]，SIMONS Jan-Robert[2]，金井　保[2]，跡見晴幸[2]，石野良純[1]（[1]九大院農，[2]京大院工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A05p06　*Thermococcus kodakarensis* のファミリー D DNA ポリメラーゼはヘリカーゼおよびプライマーゼと結合して効率的な複製装置を形成する
15:05　○沖　啓輔，永田麻梨子，高島夏希，山上　健，石野園子，石野良純（九大院農）

2A05p07　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における挿入配列の転位誘導
15:16　○竹谷達成[1]，田靡実咲[2]，大城　隆[2]，鈴木宏和[2]（[1]鳥取大院・持社創科，[2]鳥取大院・工）

2A05p08　好熱菌転位因子 *IS0169* の細胞内転位特性の解析
15:27　○鈴木宏和[1]，清水万由[2]，出口朋也[2]，大城　隆[1]（[1]鳥取大院・工，[2]鳥取大・工）

2A05p09　核様体タンパク質の一種 NdpA ホモログの相同組換え頻度に及ぼす影響の解析
15:38　○佐道陽弘，角埜裕基，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）

2A05p10　新規宿主・ベクター系の構築を目指した自己伝達性プラスミドの取得と機能解析
15:49　○前島由明[1]，仲田裕貴[1]，森内良太[2]，道羅英夫[2]，井上謙吾[3]，金原和秀[1]，新谷政己[1]　([1]静大院・総合科技，[2]静大グリーン研，[3]宮崎大・農)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A05p11　好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析
16:10　○柳谷洸輔[1]，越智健太郎[2]，仲田裕貴[1]，井上謙吾[3]，水口千穂[4]，野尻秀昭[4]，大熊盛也[5]，金原和秀[1]，新谷政己[1]　([1]静大院・総合科技，[2]静大工，[3]宮崎大・農，[4]東大・生物工学セ，[5]理研・BRC-JCM)

2A05p12　変異 *pheS* 遺伝子を用いたメタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus*（Bath）の効率的遺伝子破壊
16:21　○横江　奨[1]，石川聖人[1]，加藤創一郎[2]，堀　克敏[1]　([1]名大院工，[2]産業技術研究所)

2A05p13　枯草菌ゲノム移動を可能にする接合伝達系の構築
16:32　○板谷光泰，長谷川美紀，佐藤　満　(慶應大学先端生命研)

2A05p14　IncP-9 群プラスミド NAH7 の新規な接合伝達必須遺伝子の機能解明
16:43　○岸田康平，Tim Lucas，野々山翔太，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝　(東北大学院生命)

2A05p15　プロファージの有無がプラスミド保持株の fitness に与える影響
16:54　○LE THI THANH THU[1]，ファムティーキムユン[1]，森内良太[2]，道羅英夫[2]，金原和秀[1]，新谷政己[1]　([1]静大院・総合科技，[2]静大グリーン研)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A05p16　PCB/ビフェニル分解性シュードモナス細菌の安息香酸分解系トランスポゾン欠失株の諸性質
17:15　○廣瀬　遵[1]，米村　凌[1]，末永　光[2]，木村信忠[3]，渡邊崇人[4]，宮武宗利[1]，横井春比古[1]，二神泰基[5]，後藤正利[6]，藤原秀彦[7]，古川謙介[7]　([1]宮崎大・工，[2]産総研・創薬基盤，[3]産総研・生物プロセス，[4]京大・生存研，[5]鹿大・農，[6]佐賀大・農，[7]別府大・食物栄養)

2A05p17　乳酸菌の遺伝子組換えに用いる CRISPR/Cas9 ベクターの構築
17:26　○知久　勤[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]　([1]東農大院農，[2]東農大応生科)

2A05p18　ヒト腸内常在菌叢最優勢種 *Bacteroides dorei* におけるマーカーレス遺伝子欠損系の確立およびポリアミン代謝系遺伝子の機能解析
17:37　○阪中幹祥，杉山友太，奈良未沙希，北方　彩，栗原　新　(石川県大生資環)

2A05p19　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子が持つ IV 型線毛の機能解析
17:48　○木村知宏[1]，手塚武揚[1]，相沢慎一[2]，大西康夫[1]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]県立広島大・生命環境・生命科学)

2A05p20　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢非開裂株の取得とその原因遺伝子の同定
17:59　手塚武揚[2]，○光山京太[1]，大西康夫[2]　([1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生工)

A06 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物ー遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトームー

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A06a01　*A. oryzae* 由来代謝制御転写因子 XlnR 制御遺伝子の網羅的解析とデータマイニング
9:00　○岡　大椰[1]，兒島孝明[1]，井原邦夫[2]，小林哲夫[3]，中野秀雄[1]　([1]名大院・生命農・生命技術，[2]名大・遺伝子実験施設，[3]名大院・生命農・生物機構)

2A06a02　キメラ転写因子 $AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$ の構成的発現株によるアミラーゼ生産系の構築
9:11　○山下美春[1]，村田俊輔[1]，辻上誠也[1]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]，小林哲夫[2]　([1]名城大農，[2]名大院生命農)

2A06a03　*Aspergillus aculeatus* における UDP-glucose 4-epimerase の欠損が糖質加水分解酵素生産に与える影響
9:22　○白柳英俊，谷　修治，炭谷順一，川口剛司　(大阪府立大学)

2A06a04　*Aspergillus nidulans* における G タンパク質 α サブユニットを介したセルラーゼ生産抑制
9:33　○國武絵美[1]，李　　怡[2]，金丸京子[2]，木村　真[2]，木村哲哉[1]，小林哲夫[2]　([1]三重大院生資，[2]名大院生命農)

2A06a05　麹菌のカーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による液体培養時の菌糸形態の制御
9:44　○一瀬桜子[1]，田中瑞己[2]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]　([1]東北大院・農，[2]静県大・食栄)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A06a06　*Aspergillus fumigatus* の銅代謝機構の解析
10:05　○楠屋陽子[1]，辺　　彩[1]，萩原大祐[2]，矢口貴志[1]，高橋弘喜[1,3]　([1]千葉大 真菌センター，[2]筑波大 生命環境系，[3]千葉大 分子キラリティー)

2A06a07　窒素源が *Fusarium graminearum* に与えるトリコテセン産生への影響
10:16　○塩原拓也[1]，中嶋佑一[1]，赤坂まな美[1]，前田一行[2]，鬼頭良幸[1]，金丸京子[1]，小林哲夫[1]，木村　真[1]　([1]名古屋大院生命農，[2]明治大院農)

2A06a08　*Fusarium graminearum* における特定のアミノ酸代謝がトリコテセン生産制御に及ぼす影響
10:27　○中嶋佑一[1]，前田一行[2]，塩原拓也[1]，金丸京子[1]，小林哲夫[1]，西内　巧[3]，木村　真[1]　([1]名古屋大院生命農，[2]明治大院農，[3]金沢大 学際科学)

2A06a09　麹菌の染色体重複株から見出した二次代謝系クラスター制御因子の解析
10:38　○高橋　理，篠原靖智，小山泰二　(野田産研)

2A06a10　放線菌の長鎖 mRNA の発現情報取得の新規アプローチ〜二次代謝産物生合成遺伝子群の発現をありのまま捉える〜
10:49　○菅野　学[1]，三谷恭雄[1]，野田尚宏[2]，木村信忠[1]，田村具博[1]　([1]産総研・生物プロセス，[2]産総研・バイオメディカル)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A06a11　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成を制御する σ 因子 FliA の機能解析
11:10　○橋口優一朗，手塚武揚，大西康夫　(東大院・農生科・応生工)

2A06a12　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のべん毛形成に必須な遺伝子 *AMIS1780* の同定と機能解析
11:21　手塚武揚[2]，○前田聡史[1]，大西康夫[2]　([1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生工)

2A06a13　放線菌 *Streptomyces griseus* が保有する呼吸鎖複合体 II の銅イオン濃度特異的な転写制御
11:32　○高原薫平，上田賢志，高野英晃　(日大生資科)

2A06a14　細菌型光センサー Class III LitR の光受容に関わるシステイン残基の解析
11:43 ○角　悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃 （日大・生資科・生命研）

2A06a15　*Gordonia* 属細菌の光依存的なカロテノイド生産メカニズムの解析
11:54 榮山　新，田島　侑，荒木知珠，角　悟，高野初美，上田賢志，○高野英晃 （日大生資科・生命研）

A06 会場　午後の部(14:00〜18:10)

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A06p01　DIT1 ターミネーターと 2 つの RNA 結合タンパク質による目的タンパク質の増産
14:00 ○松山　崇[1], 伊藤洋一郎[1], 北川孝雄[2], 山西　守[2], 片平悟史[1], 井沢真吾[3], 入江賢児[4], 清木　誠[2] ([1]豊田中研, [2]山口大医, [3]京都工繊大, [4]筑波大)

2A06p02　*Thermus thermophilus* を宿主とするシリカ誘導性異種タンパク質発現システムの構築
14:11 ○藤野泰寛，渡邉修平，土居克実 （九大院農）

2A06p03　枯草菌における異種プロモーター認識能拡張の取り組み
14:22 ○渡辺　葵, 山下園加, 井上拓也, 吉川博文, 朝井　計 （東京農大院バイオ）

2A06p04　枯草菌でのラムノースで誘導される遺伝子発現系の構築
14:33 ○玉野彩香，広岡和丈 （福山大生命工・生物工）

2A06p05　枯草菌 RNA ポリメラーゼ α サブユニット遺伝子 *rpoA* の発現制御機構の解析
14:44 ○朝井　計[1]，林田莉奈[2]，白川文教[2] ([1]東京農大・バイオ, [2]埼玉大・理工)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A06p06　酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子発現におけるアミノ酸パーミアーゼの機能解析
15:05 ○今西大生, 高橋祥司, 阿部勝正, 解良芳夫 （長岡技科大・生物）

2A06p07　ビフィズス菌由来 ATPase MsiK は ABC トランスポーターを介した糖質取込みをグローバルに制御する
15:16 ○前田信悟[1]，阪中幹祥[1]，後藤愛那[2]，村上隆太[2]，加藤紀彦[2]，杉山友太[1], 谷内寛之[1], 栗原　新[1], 玉置尚徳[3], 吹谷　智[4], 横田　篤[4], 片山高嶺[1,2] ([1]石川県大生資環, [2]京大院生命, [3]鹿大農, [4]北大院農)

2A06p08　メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* における Hap 複合体構成因子の役割の違い
15:27 ○小田沙織[1]，由里本博也[2]，阪井康能[2] ([1]鳥取大工，[2]京大院農)

2A06p09　酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来転写因子 Lrp の機能解析
15:38 ○石井友理[1]，トリヌグラハアフィチャンドラ[1]，赤坂直紀[2]，東久保遥[1]，繁　宥樹[1]，佐古田久雄[2]，秀瀬涼太[1]，藤原伸介[1] ([1]関西学院大理工，[2]マルカン酢㈱)

2A06p10　*Shewanella oneidensis* における D-乳酸代謝系の制御機構と生理機能の解析
15:49 ○笠井拓哉，高妻篤史，渡邉一哉 （東薬大生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A06p11　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 における LOV-HK の機能解析
16:10 ○山本麻衣子，石井正治，新井博之 （東大院農生科・応生工）

2A06p12　*Comamonas testosteroni* TA441 の末端酸化酵素の発現制御
16:21 ○新井　凌，石井正治，新井博之 （東大院・農生科）

2A06p13　*Burkholderia multivorans* の鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群における転写制御因子 IscR の解析
16:32 ○野々山翔太，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝 （東北大院生命科）

2A06p14　PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株のカタボライト調節に関わる二成分調節系因子 BphPQ の解析
16:43 ○佐々木春菜，永田裕二，津田雅孝，大坪嘉行 （東北大）

2A06p15　pCAR1 由来カルバゾール分解系遺伝子群の発現は一細胞レベルでばらついているか？
16:54 ○山本夏実，高比良早紀，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭 (東大・生物工学セ)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A06p16　乳酸菌環境単離株における細胞表層多糖合成遺伝子の相変異機構の解析
17:15 ○江橋由夏[1]，河嶋伊都子[1]，尾花　望[2]，久保田浩美[3]，清川達則[1]，八城勢造[3]，永井　智[3]，野村暢彦[2] ([1]筑波大院・生命環境科学，[2]筑波大・生命環境，[3]花王・安全性科学研)

2A06p17　分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の転写に及ぼす影響
17:26 ○家森優佳[1]，濱川匡史[1]，秀瀬涼太[1]，兼崎　友[2]，貝沼(岡本)章子[3]，藤原伸介[1] ([1]関西学院大・理工，[2]静岡大・グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム解析部，[3]東京農大・応生科醸造)

2A06p18　小分子 RNA ChiX を介した 2 種の mRNA の転写後調節
17:37 山岸拓矢[1]，堀井恭子[1]，宗像直輝[2]，南　晴香[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，○鈴木一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化)

2A06p19　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来ビフェニルの取り込み・代謝を調節する転写制御システム
17:48 ○新沼　皐，荒木拓馬，上村直史，政井英司 （長岡技科大工）

2A06p20　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるシリンガ酸分解酵素遺伝子の転写制御因子の同定と機能解析
17:59 ○荒木拓馬，上村直史，政井英司 （長岡技科大工）

A07 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―物質生産 - 醸造，発酵(一次代謝産物)―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A07a01　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の delta 12-fatty-acid desaturase の機能解析
9:00 ○松沢智彦[1]，前原智子[1]，神坂　泰[1]，荒　学志[2]，高久洋暁[2]，矢追克郎[1] ([1]産総研 生物プロセス，[2]新潟薬大 応生科)

2A07a02　赤色油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* の油脂高蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析
9:11 ○風間春香[1]，岡　由佳[1]，小林鈴花[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，森　一樹[4]，油谷幸代[4]，荒木秀雄[5]，高久洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]産総研CBBD-OIL，[5]不二製油グループ本社)

2A07a03　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂超高蓄積変異株の取得及び油脂蓄積重要遺伝子の同定
9:22 ○春日琴葉[1]，海老名沙也佳[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，森　一樹[4]，油谷幸代[4]，荒木秀雄[5]，高久洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]産総研CBBD-OIL，[5]不二製油グループ本社)

2A07a04　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析
9:33 ○酒井里佳子[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，高久洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]不二製油グループ本社)

2A07a05　脂質工学への展開を視野に入れた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の簡易的形質転換系の開発
9:44 ○宮島温美[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，高久洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]不二製油グループ本社)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A07a06　油脂生産性向上へ向けた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の脂質工学的改変
10:05 ○小林鈴花[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]不二製油グループ本社）

2A07a07　Expression of cyclooxygenase from the red alga, *Gracilaria vermicuphylla* in filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4
10:16 ○Mohd Fazli FARIDA ASRAS[1]，Hideaki NAGANO[1]，Yoshimi SHIMADA[1]，Miho TAKEMURA[3]，Shigenobu KISHINO[1]，Akinori ANDO[1,2]，Jun OGAWA[1,2]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Ins. Biore. Biotech., Ishikawa Pref. Univ.）

2A07a08　油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種による遊離脂肪酸生産に関する検討
10:27 ○島田良美[1]，安藤晃規[1]，岸野重信[1]，櫻谷英治[2]，小川　順[1]（[1]京都大学大学院農学研究科，[2]徳島大学生物資源産業学部）

2A07a09　廃グリセロール資化性糸状菌が生産する脂肪酸代謝産物
10:38 ○村川直美[1]，加納みずほ[1]，阪本鷹行[1]，安藤晃規[2]，岸野重信[2]，相馬悠希[3]，和泉自泰[3]，馬場健史[3]，小川　順[2]，櫻谷英治[1]（[1]徳島大生物資源，[2]京大院農応用生命，[3]九大生医研）

2A07a10　麹菌を用いた遊離型高度不飽和脂肪酸の生産化
10:49 ○玉野孝一[1]，コックスロバート[2]，柘植謙爾[2]，三浦　愛[1]，伊藤あやの[3]，石井　純[2]，田村具博[1]，近藤昭彦[2]，町田雅之[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]神戸大院イノベ，[3]北海道ハイテク専門学校）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A07a11　人工 DNA 切断酵素 TALEN と一本鎖 DNA を用いた *Rhizopus* 属糸状菌における高効率相同組換え技術の確立
11:10 ○壺井雄一[1]，金田実郎[1]，高橋史員[1]，五十嵐一暁[1]，瀧村　靖[1]，佐久間哲史[2]，山本　卓[2]（[1]花王・生科研，[2]広島大院・理）

2A07a12　Rhizopus 属糸状菌における高発現プロモーターを利用した有用物質生産技術の開発
11:21 ○金田実郎，壺井雄一，髙橋史員，五十嵐一暁，瀧村　靖（花王・生科研）

2A07a13　麹菌 *A. oryzae* 由来・製麹における主要 ACP アイソザイム二重欠失株の特性
11:32 ○山下伸雄，窪寺隆文，明石貴裕（白鶴酒造㈱）

2A07a14　シアン非感受性呼吸系酵素遺伝子とオキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子を高発現させた *Aspergillus niger* によるシュウ酸生産
11:43 ○吉岡育哲，小林慶一，桐村光太郎（早大・先進理工・応化）

2A07a15　麹菌ミトコンドリア・ピルビン酸キャリアタンパク質欠損株におけるピルビン酸代謝フラックス改変による有用化合物生産
11:54 ○張　斯来[1]，若井　暁[1]，荻野千秋[2]，堤　浩子[3]，秦　洋二[3]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大イノベ，[2]神戸大工，[3]月桂冠・総研）

A07 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物ー物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）ー

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A07p01　*Aspergillus itaconicus* の *cad* 遺伝子の同定と白麹菌のイタコン酸生産能の獲得
14:00 ○野中咲希[1]，久保真紀[1]，二神泰基[2]，高下秀春[3]，小林元太[1]，後藤正利[1]（[1]佐賀大学農学部，[2]鹿児島大学農学部，[3]三和酒類 ㈱）

2A07p02　形質転換麹菌でのエルゴチオネインとセレノネインの生産
14:11 ○原　精一，市川惠一，篠原靖智，五味恵子（キッコーマン）

2A07p03　豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β-グルコシダーゼの解明
14:22 ○小野奈津子[1]，安田（吉野）庄子[1]，北本則行[2]（[1]あいち産科技総セ・食工技セ，[2]至学館大・健康科学）

2A07p04　製麹期間中の麹の乾燥が破精形成に及ぼす影響
14:33 ○伊藤一成[1]，谷野有佳[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）

2A07p05　麹菌 *Aspergillus oryzae* の接合型と表現型の関連
14:44 ○小高敦史，森本（榊原）舞子，松村憲吾，秦　洋二（月桂冠・総研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A07p06　全ゲノム情報を用いた泡盛黒麹菌を含む *Apergillus luchuensis* の系統解析
15:05 ○塚原正俊[1]，阿部峻之[1]，東　春奈[1]，外山博英[2]，水谷　治[2]，山田　修[3]（[1]株式会社 バイオジェット，[2]琉球大学農学部，[3]独立行政法人 酒類総合研究所）

2A07p07　*Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の米ぬか中に含まれる誘導物質の探索
15:16 ○眞榮田麻友美[1]，渡嘉敷正司[2]，渡嘉敷みどり[2]，上地敬子[1]，伊藤　進[1]，平良東紀[1]（[1]琉大農，[2]石川種麹店）

2A07p08　速醸酛及び山廃酛を用いた清酒醸造過程における細菌叢と真菌叢の経時的変化
15:27 ○佐藤万里，三枝静江，細井知弘（東京都立食技セ）

2A07p09　麹脂質の腸内細菌による代謝分解物質の解析
15:38 ○藤川彩美，阪本真由子，許　志豪，北垣浩志（佐賀大院農）

2A07p10　高糖野菜発酵液の発酵過程における細菌叢解析
15:49 ○邱　泰瑛[1]，須田　亙[2,3]，大島健志朗[2]，服部正平[2,4]，高橋知也[5]（[1]北見工大，[2]東京大院新領域，[3]慶応大医，[4]早大先進理工，[5]アルソアR&D）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A07p11　コリネ型細菌における長鎖脂肪酸アシル CoA の脱 CoA 化酵素の特定
16:10 ○井元瞭介[1]，川上春佳[1]，加藤峻介[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

2A07p12　コリネ型細菌における長鎖脂肪酸 CoA 化酵素の特定
16:21 ○髙橋敬祐[1]，井元瞭介[1]，川上春佳[1]，加藤峻介[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

2A07p13　コリネ型細菌における第二の潜在的なデチオビオチン輸送体の探索
16:32 ○東佳菜子[1]，中村絵梨[1]，村田紀子[1]，堀　一将[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

2A07p14　酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り替え
16:43 小林俊介[1]，岩崎還帰[1]，川口秀夫[2]，仁宮一章[1,3]，荻野千秋[4]，高橋憲司[1]，近藤昭彦[2]，○柘植陽太[1,3]（[1]金沢大理工，[2]神戸大院イノベ，[3]金沢大新学術，[4]神戸大院工）

2A07p15　コリネ型細菌は増殖できない温度下で乳酸・コハク酸を高生産する
16:54 ○水野　光[1]，豊田晃一[2]，仁宮一章[1,3]，乾　将行[2]，近藤昭彦[4]，高橋憲司[1]，柘植陽太[1,3]（[1]金沢大院・自科，[2]RITE，[3]金沢大・新学術，[4]神戸大院・イノベ）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A07p16　Corynebacterium glutamicum の Tween 40 によるグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激感受性の解析
17:15 ○澤田康之[1]，橋本賢一[2]，中松　亘[2]，曽我部正博[3]，川崎　寿[2]（[1]名経大管理栄養，[2]東京電機大工，[3]名大院医）

2A07p17　Engineering of *Escherichia coli* to facilitate efficient utilization of isomaltose and panose in industrial glucose feedstock
17:26　○Kenji ABE　(Ajinomoto Co., Inc.)

2A07p18　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸生成能と発酵中間生成物アセトアルデヒドの関係性の検証
17:37　○藪田峻也[1], 石川森夫[1], 鈴木敏弘[1], 楢崎　暢[1], 山我幹太[1], 石川泰平[1], 岸　幹也[2], 貝沼(岡本)章子[1]　([1]東京農大・応生科・醸造, [2]Mizkan Holdings 中研)

2A07p19　好熱性乳酸菌におけるペントースリン酸回路の新奇バイパスの発見
17:48　○沼口真緒[1], 善藤威史[1], 門多真理子[2], 田代幸寛[1], 酒井謙二[1], 園元謙二[1]　([1]九大院農, [2]武蔵野大環境)

2A07p20　乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* AK23 表層タンパク質の LPS 消去メカニズムに関する研究
17:59　○浅見恭子, 金内　誠, 須田義人, 松本菜月　(宮城大学)

A08 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―物質生産 - 醸造, 発酵(一次代謝産物)―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A08a01　石鎚黒茶の微生物動態に関する研究
9:00　○水野智文[1], 岩橋　均[1], 堀江祐範[2]　([1]岐阜大応微, [2]産総研)

2A08a02　鹿児島の壺造り黒酢の醸造に関わる「壺付き酢酸菌」存在の有無に関する検証
9:11　○窪田将之[1], 石川森夫[1], 鈴木敏弘[1], 兼崎　友[2], 藤田信之[3], 藤井　暁[4], 長野正信[4], 貝沼(岡本)章子[1]　([1]東京農大・応生科・醸造, [2]東京農大・ゲノムセ, [3]東京農大・生命・分子微生物, [4]坂元醸造株式会社)

2A08a03　サトウキビ搾汁液から分離した乳酸菌を用いた乳酸発酵黒糖の開発
9:22　○広瀬直人[1], 前田剛希[1], 恩田　聡[1], 伊禮　信[1], 和田浩二[2]　([1]沖縄県農研セ, [2]琉球大農)

2A08a04　生もと系酒母製造工程における微生物叢変遷の解析と乳酸生成に寄与する微生物の推定
9:33　○高橋正之, 喜多靖子, 向井伸彦　(酒総研)

2A08a05　酵母 *Saccharomyces kudriavzevii* 菌株の製パン適性
9:44　○今井涼太, 山内宏昭, 小田有二　(帯広畜産大)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A08a06　酵母 *Zygosacchromyces rouxii* 菌株の異性化糖を含む超高糖生地製パン法への適用
10:05　○谷崎　昴, 山内宏昭, 小田有二　(帯広畜産大)

2A08a07　胞子対細胞接合による製パン用 *Saccharomyces* 属交雑株の作出
10:16　○横山　愛[1], 三雲　大[2], 森谷　浩[2], 高谷政宏[3], 山内宏昭[1], 小田有二[1]　([1]帯広畜産大, [2]日本甜菜製糖㈱, [3](公財)とかち財団)

2A08a08　奈良県内の醤油蔵の蔵付微生物の分離とその性質
10:27　○都築正男[1], 清水浩美[1], 松澤一幸[2]　([1]奈良県産振セ, [2]元奈良県醤油組合)

2A08a09　圧力感受性を付与した清酒酵母株の日本酒醪中における高圧不活性化挙動の解析
10:38　○野村一樹, 片岡ちひろ, 星野浩史, 井越和彰, 氏家沙織里, 林真由美, 井口晃徳, 重松　亨　(新潟薬大・応生科)

2A08a10　酵母エキスを用いた清酒酵母拡大培養用の培地の検討
10:49　○渡部貴志, 櫛田麻希, 増渕　隆　(群馬産業技術センター)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A08a11　*Saccharomyces cerevisiae* 酵母における *Candida boidinii* 由来キシロース発酵代謝系の導入効果
11:10　○Kahar Prihardi,　紀平知枝,　大塚裕美,　荻野千秋, 近藤昭彦　(神戸大工)

2A08a12　大分県酒造協同組合蔵元酒粕からの清酒用大分酵母の獲得
11:21　○岡本啓湖[1], 小野浩輝[1], 池見俊亮[1], 掛橋　凌[1], 木村　奨[1], 張　愚皓[1], 仁平拓哉[1], 永松一馬[1], 中村俊雅[1], 日野美香[1], 藤原秀彦[1], 二階堂雅士[2]　([1]別大・食栄・発食, [2]大分県酒造協同組合)

2A08a13　新奇「岐阜大酵母」のスクリーニングと清酒発酵特性の検討
11:32　○奥村真衣[1], 平井菜未[1], 内田みなみ[1], 吉村明浩[2], 澤井美伯[2], 正木和夫[2], 二神泰基[3], 玉置尚徳[3], 向田　潤[4], 三井亮司[4], 稲垣瑞穂[1], 島田昌也[1],　早川享志[1],　中川智行[1]　([1]岐阜大応生, [2]岐阜県産業技術センター, [3]鹿児島大農, [4]岡山理科大理)

2A08a14　国酒酵母の分類学的特性と識別
11:43　○森谷千星,　門倉利守,　数岡孝幸,　竹田正久,　田中尚人, 鈴木健一朗　(東農大応生科・醸造)

2A08a15　Bafilomycin A1 耐性清酒酵母の醸造特性
11:54　○中瀬　舞, 西本　遼, 窪寺隆文, 明石貴裕　(白鶴酒造・研究)

A08 会場　午後の部(14:00〜18:10)

微生物―物質生産 - 醸造, 発酵(一次代謝産物)―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A08p01　二倍体清酒酵母から得られた一倍体株の遺伝的特徴とその醸造特性
14:00　○堀田夏紀, 村上直之, 小高敦史, 松村憲吾, 秦　洋二　(月桂冠・総研)

2A08p02　きょうかい清酒酵母の胞子形成で得られた一倍体株では染色体組換えが生じていない
14:11　○川村夏希, 花角優太, 山田美和, 下飯　仁　(岩手大農)

2A08p03　カプロン酸エチルを高生産する泡盛酵母の取得
14:22　○佐伯隆登, 仲宗根薫　(近畿大工)

2A08p04　*ILV5* 高発現によるジアセチル低生産性酵母の育種
14:33　○安川史織,　山口泰広,　砂田啓輔,　山田　翼,　末野和男, 田中伸哉　(菊正宗・総研)

2A08p05　Solvent assisted stir bar sorptive extraction(SA-SBSE)法による清酒中の Methional 分析
14:44　○駒越まるみ[1,2],　磯谷敦子[1,2],　神田涼子[1],　久保田健斗[1,2], 池田優理子[1], 藤井　力[1]　([1]酒類総研, [2]広島大院・先端研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A08p06　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 を介したエタノールストレス応答およびエタノール発酵調節
15:05　○松本拓也,　渡辺大輔,　志賀岳希,　北　侑子, アフィアティラシティヌル, 高木博史　(奈良先端大・バイオ)

2A08p07　酵母 Greatwall プロテインキナーゼを介した新規アルコール発酵調節経路
15:16　○梶原拓真[1], 渡辺大輔[1], 武田鋼二郎[2], 建部　恒[1], 塩﨑一裕[1], 高木博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ, [2]甲南大・理工)

2A08p08　酵母のアルコール発酵調節における TORC1 シグナリングとアミノ酸の効果
15:27　○渡辺大輔[1,2], 杉本幸子[1], 水野　恵[2], 周　　延[2], 陳　佳文[3], 赤尾　健[2],　下飯　仁[2,4],　前田達哉[3],　高木博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ, [2]酒総研, [3]東京大・分生研, [4]岩手大・農)

2A08p09　清酒もろみにおける酵母ヘキソーストランスポーター Hxt1 および Hxt3 の局在性の解析
15:38　○渡部保容, 山田美和, 下飯　仁　(岩手大院・農)

2A08p10　清酒酵母を特徴づける転写因子の探索と解析
15:49　○桑山翔一,　山元翔太,　人見啓介,　鹿島舞央,　門倉利守, 鈴木健一朗, 中山俊一　(東農大・院・醸造)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A08p11　次世代酒米を用いた試験醸造酒の成分分析および官能評価とメタボライトの関係
16:10　○小林拓嗣[1], 平田章悟[1,2], 畑　夕子[1], 熊崎　努[1], 森川佳奈[1], 水上留以[1], 齊藤亮太[1], 矢澤　彌[1], 岩下和裕[1,2]　([1]酒類総合研究所, [2]広島大院先端)

2A08p12　酒造好適米兵庫恋錦を用いた清酒の特徴
16:21　○高尾佳史, 山田　翼, 末野和男, 田中伸哉　(菊正宗・総研)

2A08p13　米グルテリンファミリーの米粒内局在に関する研究
16:32　○高橋　圭, 河野弘美, 奥田将生　(酒類総合研究所)

2A08p14　分裂酵母のエルゴステロール生合成遺伝子の発現調節によるスクワレンの蓄積促進
16:43　○飯沼夏生[1], 齋藤直也[2], 八代田陽子[3,4], 吉田　稔[3,4], 浜本牧子[1,2]　([1]明治大学院・農, [2]明治大学・農, [3]理研・化学遺伝, [4]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス)

2A08p15　Yeast strains isolated from Sri Lanka show higher tolerance to inhibitors derived from hydrolysis of lignocellulosic materials
16:54　○Maduka Subodinee Ahangangoda Arachchige[1], Osamu Mizutani[2], Hirohide Toyama[1,2]　([1]United graduate school of Agriculture, Kagoshima Univ., [2]Univ. Ryukyus)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A08p16　Characterization of fatty acid profile and gene expression of fatty acid desaturases at high temperature in thermotolerant isolated from *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16
17:15　○Chih chan WU[1], Takao OHASHI[1], Yung Yu TSAI[1], Ryo MISAKI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

2A08p17　Enhanced oleic acid content and lipid productivity by overexpressing delta9-fatty acid desaturase gene in the oleaginous yeast, Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16 for designed biodiesel production.
17:26　○Yung-Yu TSAI[1], Takao OHASHI[1], Chih-Chan WU[1], Ryo MISAKI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

2A08p18　流加培養した醸造用酵母の特性解析および醸造特性改善
17:37　○藤原広樹[1], 吉﨑成洋[2], 北垣浩志[3], 善本裕之[4]　([1]キリン・ワイン技術研究所, [2]キリンビール・仙台工場, [3]佐大農, [4]キリン・酒類技術研究所)

2A08p19　流加培養条件下における酵母のコハク酸生成メカニズムの解析
17:48　門脇真史[1], 藤原広樹[2], 藤丸裕貴[1], 山本裕貴[1], 吉﨑成洋[3], 善本裕之[4], ○北垣浩志[1]　([1]佐大農, [2]キリン・ワイン技術研究所, [3]キリンビール・仙台工場, [4]キリン・酒類技術研究所)

2A08p20　高リンゴ酸低酢酸生産性変異株におけるグリセロール代謝が有機酸生成に及ぼす影響
17:59　○西村友里[1], 山元翔太[1], 久保田恵理[2], 兼崎　友[2], 鈴木健一朗[1], 門倉利守[1], 中山俊一[1]　([1]東農大・院・醸造, [2]東農大・ゲノムセ)

A09 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物ー物質生産 - 発酵(二次代謝産物, 抗生物質, ペプチド, 生理活性物質)ー

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A09a01　The uniqueness of antimicrobial spectrum of ophiobolin K produced by *Aspergillus ustus*
9:00　○Natthapat SOHSOMBOON, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI　(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

2A09a02　*Aspergillus oryzae* が生産する耐塩性乳酸菌生育阻害物質 heptelidic acid の解析
9:11　○篠原靖智[1,2], 西村郁子[1,2], 小山泰二[1]　([1]野田産研, [2]現・キッコーマン)

2A09a03　子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による多価カルボン酸含有バイオサーファクタントの効率的生産
9:22　○林　真人[1], 高野真希[2], 星野一宏[2]　([1]富山大工, [2]富山大院理工)

2A09a04　アフラトキシン産生菌に対する光照射の影響
9:33　○鈴木忠宏　(農研機構食品研究部門)

2A09a05　*Aspergillus terreus* のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響
9:44　○南　智之[1], 金政　真[2]　([1]中部大院・応生, [2]中部大・環境生科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A09a06　黄麹菌 Aspergillus oryzae における初期エンドソーム動態のコウジ酸分泌への関与
10:05　○都甲祐介, 竹川　薫, 樋口裕次郎　(九州大農)

2A09a07　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるシクロピアゾン酸生合成遺伝子クラスターの新規遺伝子及び *cpaT* の解析
10:16　○楠　拓也[1], 石井幸乃[2], 菊池友希[1], 篠原靖智[3], 小山泰二[3], 徳岡昌文[2], 進藤　斉[2], 穂坂　賢[2]　([1]東農大・院, [2]東農大・応生, [3]野田産研)

2A09a08　麹菌によるクルクミン生産系の構築ーSNF1 ホモログ遺伝子の破壊による malonyl-CoA 増産効果ー
10:27　○菅英一郎[1,2], 勝山陽平[1], 丸山潤一[1], 小山泰二[2], 大西康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工, [2]野田産研)

2A09a09　糸状菌 Plectospira myriandra による C14 脂肪酸高含有油脂の生産
10:38　○横山晋太郎[1], 安藤晃規[1,2], 小川　順[1,2]　([1]京大院農, [2]京大生理化学)

2A09a10　Physicochemical screening による糸状菌由来新規アルカロイドの探索-生産培地の検討と二次代謝産物の解析-
10:49　○宮野　怜[1], 松尾洋孝[1,2], 野中健一[1,2], 塩見和朗[1,2], 高橋洋子[2], 大村　智[2], 中島琢自[1,2]　([1]北里大院・感染制御, [2]北里大・生命研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A09a11　真核微生物が生産する適合溶質に関する研究
11:10　○山下暁史[1], 山本真悠子[2], 土屋美菜子[2], 佐々木雅史[3], 堤内　要[3], 金政　真[2]　([1]中部大院・応生, [2]中部大・環境生科, [3]中部大・応生)

2A09a12　FBA を用いた出芽酵母のメバロン酸経路強化遺伝子破壊の探索と評価
11:21　○神田義貴, 戸谷吉博, 松田史生, 清水　浩　(阪大院・情報)

2A09a13　“超”高親和性型ペプチド輸送体発現酵母における香り成分生産性増強効果の解析
11:32　○中山綾花[1], Vu Thi Tuyet Lan[1], 河合　駿[2], 蟹江　慧[2], 加藤竜司[2], 河原崎泰昌[1], 伊藤圭祐[1]　([1]静県大・食栄, [2]名大院・創薬科学)

2A09a14　細胞性粘菌が生産するハロゲン化有機化合物の機能と生合成機構の解析
11:43　○飯島知之[1]，　品川知則[1]，　臼杵豊展[2]，　鈴木教之[2]，KAY Robert R.[3]，齊藤玉緒[2]　([1]上智大院・理工，[2]上智大・理工，[3]MRC分子生物学研究所)

2A09a15　Functional analysis of histidine kinase DhkM in Dictyostelium development
11:54　○Alvin SANJAYA[1]，Jiang TIANLONG[1]，Tsuyoshi ARAKI[2]，Shinkoh NANBU[2]，Tamao SAITO[2]　([1]Sophia University, Graduate School of Science and Technology, [2]Sophia University, Faculty of Science and Technology)

A09 会場　午後の部(14:00〜18:10)

微生物―物質生産 - 発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A09p01　自然界からの微生物由来新奇抗生物質の探索
14:00　○宮内勇樹, 小池美弥, 谷川　実, 浮谷基彦, 西村克史　(日本大学理工学部)

2A09p02　固／液界面培養による生物活性物質生産カビ，放線菌のスクリーニング
14:11　○小田　忍[1], 中川愛美[1], 野村聖也[1], 新家一男[2], 加賀谷紀貴[2], 河原哲平[2]，大箸信一[1]　([1]金沢工大ゲノム研，[2]産総研創薬基盤)

2A09p03　エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索
14:22　○伊豆田祥子[1]，　高坂尚平[2]，　河合　真[2]，　宮野　怜[1]，松尾洋孝[1,3]，　松本厚子[1,3]，　三浦宏美[1,3]，　野中健一[1,3]，　高橋洋子[3]，大村　智[3]，　中島琢自[1,3]　([1]北里大院・感染制御，[2]富士シリシア化学株式会社，[3]北里大・生命研)

2A09p04　放線菌二次代謝産物の物理化学的性状を指標としたphysicochemical screening による新規物質の探索
14:33　○中島琢自[1,2], 宮野　怜[2], 松尾洋孝[1,2], 中西　淳[3], 高橋洋子[1], 大村　智[1]　([1]北里大・生命研，[2]北里大院・感染制御，[3]物質・材料研)

2A09p05　Isolation and Characterization of Antibacterial Compound from Traditional Indonesia Fermented Soybean
14:44　○Dewi Kusumah[1]，　Isamu Maeda[1,2]　([1]Unit.Grad.Sch. Agric.Sci., Tokyo.Univ.Agric.Technol, [2]Sch.Agric., Utsunomiya Univ.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A09p06　*Streptomyces* sp. No. 3 株が生産する水溶性塩基性抗生物質の精製
15:05　○阿部優依奈，荒谷　博，村上周一郎　(明治大学)

2A09p07　放線菌様細菌 Thermosporothrix hazakensis が生産する抗生物質に関する研究
15:16　○佐藤実人[1]，天野昭一[1]，矢部修平[2]，横田　明[2]，吉成知也[3]，降旗一夫[4]，作田庄平[4]，高野初美[1]，上田賢志[1]，高野英晃[1]　([1]日大生資科，[2]東北大院農，[3]国立衛研，[4]東京大院農)

2A09p08　*Dietzia* sp. 1-5 株が生産するバイオサーファクタントに関する研究
15:27　○天笠萌実[1]，細川千都世[2]，吉田晴香[2]，村上周一郎[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

2A09p09　*Stenotrophomonas maltophilia* のシデロフォアタイプの検討
15:38　○久富　敦[1]，志波　優[2]，藤田信之[2]，田中尚人[1,2]　([1]東京農大院・醸造，[2]東京農大・分子微生物)

2A09p10　放線菌 *S. incarnatus* のシネフンギン生産に及ぼす物理・化学ストレスの効果
15:49　○田村　隆, 中島佑里子, 根本理子, 稲垣賢二　(岡山大院)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A09p11　無機リン酸による放線菌ホルモンの生産誘導
16:10　○若松拓也，木谷　茂，仁平卓也　(阪大・生物工学国際交流セ)

2A09p12　未知生合成クラスターの異種発現による新規ポリケタイド化合物の同定
16:21　○木谷　茂[1]，パイトアイヴィ[1]，小椋康平[1]，ウラノバダナ[2]，荒井雅吉[3], 池田治生[4], 仁平卓也[1]　([1]阪大・生物工学国際交流セ, [2]高知大・農林海洋科学，[3]阪大・薬，[4]北里大・北里生命科学研究所)

2A09p13　抗生物質生産を誘導する SRB ブテノライド型シグナル分子の分子多様性解析
16:32　○住吉美保，手島愛子，荒川賢治　(広島大院・先端研)

2A09p14　放線菌 *Streptomyces rochei* の二次代謝制御系の解析と物質生産への応用
16:43　○見﨑裕也，岩國美由季，高橋　譲，鈴木敏弘，木梨陽康，荒川賢治　(広島大院・先端研)

2A09p15　*Streptomyces griseus* 由来 A-factor 受容体 ArpA の発現，精製，結晶化
16:54　○夏目　亮[1,2]，　稲葉龍生[2]，　藤田雄太[1]，　若林玖実[1]，小野寺真紀[1]，加藤雄己[2]，和田英嗣[2]　([1]東電大工，[2]東電大院工)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A09p16　放線菌の単コロニー化がその生育及び二次代謝に及ぼす影響の解析
17:15　○森本　諒[1], 丸山友子[2], 濱渦亮子[3], 小谷真也[4], 保坂　毅[1,2,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研，[4]静岡大農)

2A09p17　放線菌の二次代謝に対するリンコマイシンの濃度依存的活性化作用の解析
17:26　○向井慶一郎[1]，　石塚美咲[2]，　今井　優[3]，　下野和真[1]，保坂　毅[1,2,4]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]ノースイースタン大，[4]信州大バイオメディカル研)

2A09p18　放線菌における 23S rRNA 遺伝子変異の特性と二次代謝活性化への関与の解析
17:37　○星野　颯[1]，今井　優[2]，濵渦亮子[3]，保坂　毅[3]　([1]信州大総合理工，[2]ノースイースタン大，[3]信州大先鋭領域融合研究群)

2A09p19　アラレマイシン生産菌の標的酵素ポルフォビリノーゲンシンターゼの解析
17:48　○小林拓真，上田沙蘭，岩井伯隆，和地正明　(東工大生命理工学院)

2A09p20　遺伝子組み換え技術を用いた nocardithiocin 誘導体の作製と機能解析
17:59　○酒井香奈江[1,2]，　酒井麻衣[3]，　川原聖也[3]，　今西　進[3]，原田健一[3]，　五ノ井透[1]　([1]千葉大真菌セ，[2]神戸大イノベ，[3]名城大薬)

A10 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A10a01　アデニル化酵素を利用した芳香族カルボン酸アミドの合成
9:00　○佐々木楓, 鈴木　伸, 木野邦器　(早大・先進理工・応化)

2A10a02　アスパラギン合成酵素を利用した β-アスパルチルアミド合成
9:11　○鈴木　伸，宇留野樹生，木野邦器　(早大・先進理工・応化)

2A10a03　組換え大腸菌による乳酸ベースオリゴマーの分泌生産と高分子合成への応用
9:22　○松本謙一郎[1]，ウツノミアカミラ[1]，堀　千明[1]，田口精一[2]　([1]北大院工，[2]農大生命科学)

2A10a04　モノマー組成制御された乳酸ベースオリゴマーの分泌生産
9:33　○廣江綾香[1,2]，　増永　凛[1]，　佐藤千絵[1]，　松本謙一郎[3]，田口精一[1,3]　([1]東京農大，[2]JST-MIRAI，[3]北大院工)

2A10a05　転写因子欠失株を用いた乳酸ベースポリマー生産大腸菌のリモデリング
9:44　○門屋亨介[1,2]，　児玉　悠[3]，　松本謙一郎[3]，　大井俊彦[2,3]，田口精一[1,2]　([1]東京農業大学，[2]JST-CREST，[3]北海道大学)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A10a06　*shinella* sp. NN-6 株由来のケトース 3-エピメラーゼの精製，諸性質の検討と D-プシコース生産への応用
10:05　○池田　光[1]，野崎智帆[1]，堀　玄澄[1]，鈴木琢磨[1]，森本兼司[2]　([1]香川大院農，[2]国際希少糖研究教育機構)

2A10a07　*Shinella* sp. NN-6 由来 D-キシロースイソメラーゼと D-プシコース 3-エピメラーゼを用いた D-キシロースからの D-キシルロース，D-リブロースの一括生産
10:16　○鈴木琢磨[1]，堀　玄澄[1]，池田　光[1]，森本兼司[2]　([1]香川大学農，[2]国際希少糖研究教育機構)

2A10a08　1-プロパノール発酵生産のための組換え大腸菌の代謝改変に関する研究
10:27　○長谷川亮，松原　充，服部佑紀，片岡道彦　(阪府大院・生環科・応生科)

2A10a09　組換え大腸菌を用いた 1-プロパノール発酵生産のための酵素遺伝子発現系の構築
10:38　○松原　充，服部佑紀，長谷川亮，片岡道彦　(阪府大院・生環科・応生科)

2A10a10　*Fusarium* sp. No.17 株由来のアクリル酸水和酵素に関する研究
10:49　○堀部優太，柳川顕秀，西川恵美，西本菜津紀，松原　充，片岡道彦　(阪府大院・生環科・応生科)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A10a11　ショウガ搾汁液中の 6-ジンゲロールの微生物反応による配糖化に関する研究
11:10　○鈴木達也[1]，松本里佳[1]，佐藤浩志[2]，上田　誠[1]　([1]小山高専物質工学科，[2]日生バイオ株式会社)

2A10a12　微生物反応によるネロールの配糖化に関する研究
11:21　○高橋一樹[1]，寺内一星[1]，小野満里江[1]，佐藤浩志[2]，上田　誠[1]　([1]小山高専物質工学科，[2]日生バイオ株式会社)

2A10a13　食品用酵母の物質変換能力を利用した環境浄化の試み
11:32　○深海あすか，斎田陽介，尾形智夫　(前橋工科大生物工)

2A10a14　エキソ型アルギン酸リアーゼによる多糖アルギン酸の分解物 DEH はアミノ基と非酵素的に反応する
11:43　○中田翔太[1]，松岡史也[2]，柏原貴幸[2]，村田幸作[3]，橋本　渉[1,2]，河井重幸[1,2]　([1]京大農，[2]京大院農，[3]摂南大理工)

2A10a15　セルロース分解海洋細菌 Gilvimarinus japonicus が生産する多糖分解酵素の解析
11:54　○上妻昌生，藤井克彦　(山口大農)

A10 会場　午後の部(14:00〜18:10)

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A10p01　S-GAM 法によるメタゲノムからの新規 SMO 類縁遺伝子の取得・解析
14:00　○戸田　弘，伊藤伸哉　(富山県大・生工研セ)

2A10p02　*Komagataeibacter medellinensis* のラクトース酸化活性は高ラクトース濃度で誘導される
14:11　○桐生高明，木曽太郎，駒　大輔，田中重光，村上　洋　(大阪産業技術研究所　森之宮センター)

2A10p03　*Pichia farinosa* NBRC0462 株が産生するフルオロケトン還元酵素の遺伝子クローニングと諸性質検討
14:22　○釜井彩花[1]，　七田沙耶香[2]，　三木慎介[3]，　礒部公安[1,2]，日比　慎[1]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子㈱)

2A10p04　無水糖を資化する好熱菌の生育特性
14:33　○岩崎慎太郎[1]，吉田信行[1]，平井宏和[2]，濱口徳寿[2]　([1]静大院・総合科技，[2]日本食品化工㈱)

2A10p05　*Microbacterium foliorum* NBRC103072 による環状リポデプシペプチド tolaasin 除去機構
14:44　○富田　駿[1]，須恵雅之[2]，梶川揚申[2]，五十君靜信[2]，篠原弘亮[3]，横田健治[2]　([1]東農大院農化，[2]東農大応生科，[3]東農大農)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A10p06　ミトコンドリア代謝の抑制による出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産能力の向上
15:05　○森田啓介[1]，松田史生[1]，岡本浩二[2]，石井　純[3]，近藤昭彦[3]，清水　浩[1]　([1]阪大院・情報，[2]阪大院・生命，[3]神戸大院・イノベ)

2A10p07　Leuconostoc mesenteroides が生産する不溶性グルカンとゼオライトを用いた凝集剤の調製
15:16　○玉木友理[1]，松村杏菜[1]，川井貴裕[1]，立木　隆[2]，矢野成和[1]　([1]山形大院理工，[2]立命館大生命科学)

2A10p08　麹菌 *Aspergillus oryzae* の α-グルコシダーゼが清酒中のオリゴ糖生成に及ぼす影響
15:27　○小林泉美[1]，本田千尋[1]，山田真理子[1]，徳岡昌文[2]，進藤　斉[2]，穂坂　賢[2]　([1]東農大院・農，[2]東農大・応生)

2A10p09　アミノ酸ラセミ化能を有するヒト腸内細菌の探索
15:38　○森川拓磨，岡田奈津実，岸野重信，小川　順　(京大院農・応用生命)

2A10p10　イタコン酸を変換する嫌気性菌の探索と代謝経路解析
15:49　松岡智里[1]，○冨田紳之佑[1]，竹内道樹[2]，日比　慎[3]，高橋里美[2]，小川　順[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]富山県大工・生工研セ)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A10p11　タンデム酵素反応を利用した(+)-alliin 生産の為のバイオプロセス開発
16:10　○飯星貴幸[1]，日比　慎[2,3]，小園祥子[1]，竹内道樹[2]，高橋里美[2]，小川　順[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]富山県大工・生工研セ)

2A10p12　乳酸菌 *Lactobacillus farciminis* KB1089 株におけるシニグリン代謝に関わる酵素系の解析
16:21　○渡邊寛子[1]，岸野重信[1]，宇佐美陸[1]，小佐田健吾[1]，青木雄大[2]，菅沼大行[2]，　青木　航[1]，　小川　順[1]　([1]京大農，[2]カゴメ株式会社イノベーション本部)

2A10p13　インジゴ還元菌におけるメディエーターの影響とその機能解析
16:32　○清藤鈴奈[1]，竹内道樹[2]，久郷将見[1]，多田真奈巳[3]，阪本鷹行[3]，櫻谷英治[3]，　小川　順[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]徳大・生物資源)

2A10p14　ロドコッカス発現システムを用いたピリドキサミンの産生
16:43　○山村栄虎，藤本　昇　(協和ファーマケミカル株式会社)

2A10p15　Flavin prenyltransferase 発現によるプロトカテク酸脱炭酸酵素の活性化
16:54　○栗本祐樹，尾形拓哉，坂元君年，園木和典　(弘前大院・農学生命)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A10p16　組換え大腸菌で生合成された色素を用いる光触媒的補酵素再生
17:15　○本田裕樹，藤井　浩　(奈良女子大・理・化学)

2A10p17　微生物由来酵素を用いたカテコール体セサミンの合成
17:26 ○周　　碩，熊野匠人，橋本義輝，小林達彦（筑波大院生命環境）

2A10p18　産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* の GPI 型糖転移酵素 AgtA の生物学的機能解析
17:37 ○小泉亜未[1]，矢野成和[2]，宮澤　拳[1]，吉見　啓[3]，佐野元昭[4]，阿部敬悦[1,3]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]山形大院理工，[3]東北大・NICHe，[4]金沢工大・ゲノム研）

2A10p19　*Arthrobacter* sp. K8 由来オルセリン酸脱炭酸酵素の特性解析と当該酵素を利用した有用芳香族ヒドロキシカルボン酸合成
17:48 ○村瀬諒太[1]，原良太郎[2]，椛沢　遼[1]，広川安孝[2]，木野邦器[1,2]（[1]早大・先進理工・応化，[2]早大・理工総研）

2A10p20　Lysobacter enzymogenes MK9-1 が生産するグルカナーゼとキチナーゼの特性評価
17:59 ○菅野春樹[1]，高橋　譲[1]，若山　守[2]，今野博行[1]，矢野成和[1]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命科学）

A11 会場　午後の部（14:00〜17:26）

環境科学・バイオマス利用
―資源変換，資源再生利用/環境汚染物質/その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A11p01　木材腐朽菌による加硫天然ゴムの分解
14:00 ○佐藤　伸（公立鳥取環境大学）

2A11p02　環境汚染物質 1,4-ジオキサン分解菌の分類及び菌体膜脂肪酸の分析
14:11 ○佐藤　駿，倉根隆一郎（中部大学）

2A11p03　微生物によるテレフタル酸の分解および有用物質の生産
14:22 ○中島鈴佳[1]，内堀孝博[2]，金森　拓[3]，中島敏明[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]パナック工業，[3]筑波大）

2A11p04　活性汚泥中の微生物叢の解析
14:33 ○牧野陽介，池田衣里，川口悟史，角野立夫，三浦　健（東洋大学 応用生物科学）

2A11p05　球磨焼酎粕を利用した光合成細菌の培養とその農業利用
14:44 ○宮坂　均[1,4]，古賀　碧[1,2]，岩本康成[1]，平川夕貴[1]，馬場育美[1]，中原達雄[3]，　島谷俊毅[3]，　藤原和利[3]，　松浦ゆかり[4]，　内田英雄[4]，山口　学[4]，　後藤みどり[2]，　森瀬太一[2,4]，　鈴木良平[5]，　林　修平[1]，山本進二郎[1]（[1]崇城大応用生命，[2]崇城大学Ciamo，[3]丸善製薬，[4]次世代のためにがんばろ会，[5]日立建機）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A11p06　特定外来生物ナガエツルノゲイトウおよびウスゲオオバナミズキンバイの好気性高温堆肥発酵処理に関わる微生物叢の解析
15:05 ○吉井貴宏，杉原孝文，古井義博，矢野紘子，森屋利幸，志村有通，大島泰郎（共和化工・環境微生物研）

2A11p07　沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）の付着微生物の菌叢解析とマンガン酸化物の生成
15:16 ○原田英美子，吉崎翔平，市川義崇，辻　康介，田辺（細井）祥子（滋賀県大環境科学）

2A11p08　セキショウ（*Acorus gramineus*）の根圏から単離した細菌による銀および金ナノ粒子の合成
15:27 ○黒田真史[1]，南川泰輝[1]，キムミンス[2]，井上大介[1]，惣田　訓[3]，西川　宏[2]，池　道彦[1]（[1]阪大院工，[2]阪大接合研，[3]立命館大理工）

2A11p09　金属を高蓄積する大腸菌の育種
15:38 ○小島文歌[1]，　山本兼由[1,2]（[1]法政大院・理工，[2]マイクロナノテクセンター）

2A11p10　*Shewanella* 属内における金属腐食細菌の分布と腐食能
15:49 ○土屋伸晃[1]，飯野隆夫[2]，伊藤公夫[3]，大熊盛也[2]，高品知典[1]，伊藤　隆[2]（[1]東洋大生命，[2]理研BRC-JCM，[3]新日鐵住金）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A11p11　カキにおけるカドミウム結合物質の探索
16:10 ○川上和宏[1]，陳　嘉上[1]，永田宏次[1]，吉村悦郎[1,2]，鈴木道生[1]（[1]東京大農，[2]放送大）

2A11p12　美容素材としてのオリーヴ枝の可能性について
16:21 ○岸本憲人，岩田佳奈（小豆島ヘルシーランド株式会社・オリーヴ健康科学研究所）

2A11p13　アセトン共存下における DNPH 含有フィルター上でのホルムアルデヒドの反応性
16:32 ○井上直子，鷹屋光俊（労働者健康安全機構・安衛研）

2A11p14　浮遊粒子に含まれる生物情報に関する研究
16:43 ○遠藤優輝[1]，魯　文浩[1]，竹久祥悟[1]，佐脇和真[1]，岩橋　均[1]，高橋淳子[2]（[1]岐阜大応微，[2]産総研）

2A11p15　栄養塩濃度変化が与える円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリス形成への影響
16:54 ○新井真子[1]，鈴木道生[2]，長坂征治[1]（[1]東洋大院生命，[2]東大院農）

p16 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A11p16　露地精密農業の包括的土壌評価における土壌 ATP 量指標の活用可能性
17:15 ○万里千裕，五十嵐由美子（㈱日立製作所）

A12 会場　午前の部（9:00〜12:05）

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

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A12a01　酸素ラジカル処理による植物バイオマス分解の活性化
9:00 ○祖父江真帆[1]，酒井杏匠[1]，上條順也[1]，糀谷紗季[1]，田中優太[2]，田中健太[1]，前林正弘[1]，呉　準席[2]，伊藤昌文[2]，堀　　勝[3]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大・農，[2]名城大・理工，[3]名大・未来社会創造機）

2A12a02　シロイヌナズナを利用したリグニン改変遺伝子の探索
9:11 ○徳江洋介[1,2]，坂本真吾[1]，上村直史[2]，梶田真也[3]，政井英司[2]，光田展隆[1]（[1]産総研・生物プロセス，[2]長岡技科大・生物，[3]東京農工大・生物）

2A12a03　孟宗竹の総合利用に関する研究
9:22 ○関本智登[1]，藤田誠史[2]，大場尚子[2]，安部智子[1,2]，椎葉　究[1,2]（[1]東京電機大学 生命理工学専攻，[2]東京電機大学 生命理工学系）

2A12a04　工場排水を用いたウキクサバイオマス生産への取り組み
9:33 ○小林美水[1]，岡田全朗[2]，小山時隆[2]，遠山　忠[3]，森　一博[3]，三輪京子[1]，森川正章[1]（[1]北海道大院・環境，[2]京都大院・理，[3]山梨大院・総合）

2A12a05　リグニン分解微生物とセルロース分解微生物を併用した，バイオエタノール生産法の検討
9:44 ○野本梨恵，白井拓磨，藤井克彦（山口大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A12a06　水酸化カルシウムと混合－湿式粉砕後に常温貯蔵処理を行った稲わら，エリアンサスの Ca 洗浄・糖化効率評価
10:05 ○山岸賢治[1]，池　正和[1]，関　　笛[1]，我有　満[2]，徳安　健[1]（[1]農研機構食品研究部門，[2]農研機構食品中央農業研究センター）

2A12a07　海洋性菌叢によるキチン含有廃棄物からの有用物質生産
10:16 ○喜多晃久[1,3]，　三浦豊和[1,3]，　岡村好子[1,3]，　秋　庸弘[1,3]，松村幸彦[2,3]，　田島誉久[1,3]，　加藤純一[1]，　中島田豊[1,3]（[1]広大院・先端研，[2]広大・工，[3]JST-CREST）

2A12a08　β-グルコシダーゼ発現大腸菌体添加による嫌気性細菌のセルロース糖化
10:27 ○苅田修一[1]，市原舞子[2]，市川俊輔[3]，小杉昭彦[4]（[1]三重大生資，[2]三重大地域イノベ，[3]三重大教育，[4]JIRCAS）

2A12a09　好熱嫌気性セルロソーム生産菌 *Herbivorax saccincola* A7 の特徴とゲノム解析
10:38　○藍川晋平[1]，BARAMEE Sirilak[2]，SERMSATHANASWADI Junjarus[2]，THIANHENG Phakhinee[1]，四方亜弓[3]，荒井隆益[1]，WAEONUKUL Rattiya[2]，小杉昭彦[1,3]　([1]国際農研，[2]KMUTT，[3]筑波大院生命環境)

2A12a10　*Clostridium cellulovorans* による多様なセルロース系バイオマスを活用したバイオリファイナリー構築
10:49　○富田寿男[1]，岡崎文美[1,2,3]，田丸　浩[1,2,3]　([1]三重大学生物資源，[2]三重大学生物資源バイオインフォ，[3]三重大学生物資源スマートセル)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A12a11　堆肥から分離したリグノセルロース可溶化能を有する好熱嫌気性微生物集団の特徴化
11:10　○四方亜弓[1]，SERMSATHANASWADI Junjarus[2]，THIANHENG Phakhinee[3]，WAEONUKUL Rattiya[2]，NHIM Sreyneang[2]，UNGKULPASVICH Umbhorn[1]，長岡(中薗)栄子[3]，藍川晋平[3]，荒井隆益[3]，小杉昭彦[1,3]　([1]筑波大院生命環境，[2]KMUTT，[3]国際農研)

2A12a12　非加熱・無殺菌米副産物からの光学活性乳酸の生成とSSF 中微生物菌叢構造との関連
11:21　○渡辺昌規[1]，山村勇太[1]，牧野将浩[2]，柏村　崇[2]，竹中慎治[3]，塩野忠彦[4]，佐々野和雄[5]　([1]山形大農，[2]㈱サタケ，[3]神大院農，[4]広島総技研・食工技セ，[5]食協㈱)

2A12a13　多核固体 NMR によるコーヒー生豆および焙煎豆の細胞壁の構造解析
11:32　○川村　出，金井典子　(横国大 理工)

2A12a14　発酵阻害物質を含むバイオマス糖化液を用いた乳酸発酵生産における阻害耐性株の効率的育種
11:43　○前田貴行，山本恭士，湯村秀一，宮奥康平　(三菱ケミカル株式会社)

2A12a15　大型藻類主要多糖であるアルギン酸を直接資化する酵母の分子育種
11:54　○黒田浩一[1]，高木俊幸[1]，佐々木勇輔[1,2]，元根啓佑[1]，植田充美[1]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・総合生存)

A12 会場　午後の部(14:00〜18:10)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A12p01　湿式ミリング処理木質バイオマススラリーからのメタン生成に及ぼす栄養源添加の効果
14:00　糸永　誠[1]，松尾健司[1]，ナバロロナルド[2]，金原和秀[3]，大塚祐一郎[2]，中村雅哉[2]，佐々木慧[4]，田島誉久[1]，加藤純一[1]，○中島田豊[1]　([1]広島大院先端，[2]森林総合研究所，[3]静大院工，[4]広国院大工)

2A12p02　湿式ミリング処理法を用いた木質バイオマスの連続的メタン発酵プロセスの実証試験
14:11　○松尾健司[1]，糸永　誠[1]，ナバロロナルド[2]，金原和秀[3]，大塚祐一郎[2]，中村雅哉[2]，佐々木慧[4]，藤村　治[4]，佐々木健[4]，田島誉久[1]，加藤純一[1]，中島田豊[1]　([1]広島大院先端物質，[2]森林総合研究所，[3]静岡大院総合科学技術，[4]広島国際学院大工)

2A12p03　Microbial community dynamics during anaerobic digestion of SESC-treated woody biomass
14:22　○Ronald Navarro[1]，Yuichiro Otsuka[1]，Masaya Nakamura[1]，Tomoyuki Hori[2]，Hiroshi Habe[2]，Kenji Matsuo[3]，Kei Sasaki[4]，Ken Sasaki[4]，Kazuhide Kimbara[5]，Yutaka Nakashimada[3]，Junichi Kato[3]　([1]Forestry and Forest Products Research Institute, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [3]Hiroshima University, [4]Hiroshima Kokusai Gakuin University, [5]Shizuoka University)

2A12p04　固定化光合成細菌ビーズを用いた木質バイオマス糖化液のメタン発酵消化液の浄化処理
14:33　○佐々木慧[1]，中村　薫[1]，藤村　治[1]，松尾健司[2]，ナバロロナルド[3]，中島田豊[2]，金原和秀[4]，大塚祐一郎[3]，中村雅哉[3]，加藤純一[2]，佐々木健[1]　([1]広国院大工，[2]広大院先端，[3]森林総合研究所，[4]静大院工)

2A12p05　水田での高効率なバイオメタン生産法(GET システム)の確立に関する研究
14:44　○柴田康平，森下創太，陳　韶華，大場正春，平野達也，村野宏達，林　義明，前林正弘，片山好春，田村廣人　(名城大農)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A12p06　比較トランスクリプトーム解析による *Pseudomonas* 属細菌由来レブリン酸代謝系酵素遺伝子の取得と機能解析
15:05　○羽部　浩[1]，小池英明[2]，佐藤由也[1]，飯村洋介[1]，稲葉知大[1]，堀　知行[1]，菅野　学[2]，木村信忠[2]，桐村光太郎[3]　([1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロセス，[3]早大・先進理工)

2A12p07　膜利用発酵リアクターによるエタノール収量向上メカニズムの解明
15:16　○井手深雪，耳塚　孝，須田和美，日笠雅史，山田勝成　(東レ株式会社)

2A12p08　バイオマス変換用途向け膜プロセス開発
15:27　○畠平智子，志村芙美，志村　俊，小林　敦，武内紀浩，耳塚　孝，木村将弘　(東レ㈱)

2A12p09　ヨシを用いたバイオエタノール生産における最適糖化酵素の検討
15:38　○大石孝太，高品知典　(東洋大院・生命科学)

2A12p10　異なる種菌による複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物生産
15:49　○田代幸寛[1]，石田勇貴[1]，木村知弘[1]，奥川友紀[1]，宮本浩邦[2,3]，酒井謙二[1]　([1]九大院・農，[2]千葉大・園芸，[3]サーマス)

p11〜p14 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A12p11　単細胞紅藻シゾンにおけるグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ過剰発現によるトリアシルグリセロール蓄積機構の解析
16:10　○福田　智，平澤英里，田中　寛，今村壮輔　(東工大 化生研)

2A12p12　単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるトリアシルグリセロール生合成に関わる遺伝子の発現制御メカニズムの解析
16:21　○高橋颯太，瀧　景子，河瀬泰子，福田　智，田中　寛，今村壮輔　(東工大 化生研)

2A12p13　ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を利用した Milking 方式によるバイオ燃料生産の生産性向上
16:32　○加藤明宏[1,4]，高谷信之[1,4]，池田和貴[2,4]，愛知真木子[3,4]，前田真一[1,4]，小俣達男[1,4]　([1]名大・院・生命農，[2]理研・IMS，[3]中部大・応用生物，[4]JST MIRAI)

2A12p14　ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 遊離脂肪酸生産株の低温環境下における生育不良の要因
16:43　○氣多澄江[1,4]，猿橋保乃佳[1]，高谷信之[2,4]，池田和貴[3,4]，小島幸治[2]，松本宇生[1]，小俣達男[2,4]，愛知真木子[1,4]　([1]中部大応用生物，[2]名大院生命農，[3]理研IMS，[4]JST-MIRAI)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A12p16　乳酸を利用した水素発酵技術の開発
17:15　○若井祐樹，大西章博，藤本尚志，蒋　紅与　(東農大)

2A12p17　超好熱菌によるキチンからの水素生産系の構築
17:26　○金井　保[1,2]，Aslam Mehwish[1]，堀内あゆみ[1]，Simons Jan-Robert[1,2]，Jha Savyasachee[1,2]，山田将大[1]，小谷　徹[1]，藤本理夏子[1]，山本康之[1]，郡司遼馬[1]，今中忠行[2,3]，跡見晴幸[1,2]　([1]京大院工，[2]CREST・JST，[3]立命・総合科技研)

2A12p18　白色腐朽菌による木質バイオマスからの好気的水素産生に関する研究
17:37　○高橋沙綾[1]，森　智夫[2]，河岸洋和[2,3,4]，平井浩文[2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大農・応生科，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

2A12p19　*Rhodobacter sphaeroides* の代謝改変による酢酸からの水素収率の向上
17:48　○清水　哲[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

2A12p20　イソプレノイド生合成酵素スクリーニング系の構築
17:59　○町田裕樹[1,2]，生出伸一[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

A13 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A13a01　オリゴ糖類の摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討
9:00　○岡崎由佳子，久保葉月，本間れいか，関根史織，高橋李奈　([1]藤女子大・人間生活)

2A13a02　メイラード反応生成香気(DMHF)曝露が脳内遺伝子発現に及ぼす影響
9:11　○横山壱成[1]，中井雄治[2]，鈴木喜博[1]，大畑素子[3]，小宮佑介[1]，有原圭三[1]　([1]北里大獣医，[2]弘前大食料研，[3]日大生資科)

2A13a03　血球トランスクリプトーム解析の高精度化にむけた血液処理方法の検討
9:22　○野原正勝[1]，安岡顕人[1]，嶋田耕育[1]，亀井飛鳥[1]，篠崎文夏[1]，豊田　集[1]，飯尾将太[1]，阿部啓子[1,2]　([1]産技総研，[2]東大院)

2A13a04　加熱処理 Lactobacillus crispatus KT-11 の摂取が口腔内環境に与える影響
9:33　○渡邉　樹[1]，齋藤真規[2]，友清　帝[1]，飛田啓輔[1]　([1]株式会社キティー，[2]日大松戸歯学部)

2A13a05　酵素合成 β-1,3-グルカンの抗気管支喘息作用
9:44　○川﨑悠矢[1]，西尾昌洋[1]，中川奈美[1]，河野光生[2]，磯野直人[1]，栗谷健志[1]，梅川逸人[1]　([1]三重大院生物資源，[2]三重大院医)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A13a06　Chemical, microbiological and functional analysis of kefir grown in cow milk and soymilk
10:05　○Raul Ricardo GAMBA[1]，Shihori YAMAMOTO[1]，Tetsuya SASAKI[2]，Toshihide MICHIHATA[2]，Takashi KOYANAGI[1]，Toshiki ENOMOTO[1]　([1]Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University, [2]Chemistry/Food Department, Industrial Research Institute of Ishikawa)

2A13a07　塩ストレス条件下で栽培したトマト果実に発現するマイクロ RNA の解析
10:16　○朝倉浩子，山川　隆，阿部啓子，朝倉富子　(東大院・農生科)

2A13a08　アミロイド形成の可視化を目的とした新規量子ドットプローブの創製
10:27　○飯田陽一[1]，片山　茂[1]，三谷昌一[1]，中林昌基[1]，徳楽清孝[2]，中村宗一郎[1]　([1]信州大院農，[2]室蘭工大院工)

2A13a09　渋味を呈するポリフェノールの分子特性解析
10:38　○前迫一輝[1]，辻　愛[1]，小林麻貴[1]，伊藤圭祐[2]，小林彰子[3]，赤川　貢[4]，越阪部奈緒美[5]，石井剛志[1]　([1]神戸学院大栄養，[2]静岡県大食栄，[3]東大院農，[4]大阪府大院生命環境，[5]芝浦工大システム理工)

2A13a10　梅抽出液の美白効果及び抗酸化活性
10:49　○本間知夫[1]，須永奈央[1]，中里　柊[1]，地下まゆみ[2]　([1]前橋工科大生物工学，[2]大阪大谷大教育)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A13a11　6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate induces aldehyde dehydrogenase via Nrf2/ARE pathway in HepG2 cells
11:10　○Sihao YUAN，Yasukiyo YOSHIOKA，Tomoya KITAKAZE，Hitoshi ASHIDA　(Kobe Univ.)

2A13a12　酵素合成グリコーゲンの認知機能低下抑制効果と大脳皮質のメタボローム解析
11:21　○嶋　七海[1]，片山　茂[1,2]，市川紗貴[1]，加藤和子[3]，古屋敷隆[3]，三谷塁一[1,2]，中村宗一郎[1]　([1]信州大農，[2]信州大先端領域，[3]江崎グリコ㈱)

2A13a13　食品機能成分によるトランスサイレチンの安定化と加齢性疾患に対する有効性の検討
11:32　○谷本　暁，奥田真友美，NongQuynh Nga，松原主典　(広島大院・教育)

2A13a14　栽培中ダイズが有する機能性の日内リズム解析
11:43　○西口弥生，白石翔太，佐伯雄一，窄野昌信，榊原啓之　(宮崎大学農)

2A13a15　イソチオシアネート―リジン付加体の薬物代謝酵素発現への影響
11:54　○中村俊之[1]，加藤陽二[2]，村田芳行[1]，中村宜督[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]兵庫県大・環境人間)

A13 会場　午後の部(14:00〜18:10)

食品―食品機能・栄養 - その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A13p01　マガキ(*Crassostrea gigas*)の成長周期と金属利用に関する研究
14:00　○吉城由美子，宮野紗希，石黒未紗，本間直人　(石川県大食科)

2A13p02　ピーナッツ薄皮抽出液の抗インフルエンザウイルス活性
14:11　○渡邊　健[1]，マカウジュリアンジェンビ[1]，田島民雄[2]，西田教行[1]　([1]長崎大院・医歯薬，[2]日本ピーナッツ協会)

2A13p03　漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 が肌状態に与える影響検討
14:22　○大矢あゆ美，森下美香　(東海漬物)

2A13p04　セサモリンによる S2 細胞内タンパク質の変動解析
14:33　○成川由希菜，勝崎裕隆　(三重大大学院)

2A13p05　食品成分の活性値と作用機序の同時推定方法(第 2 報)
14:44　○永浜清子，山森一人，江藤　望，西山和夫，水光正仁，榊原陽一　(宮崎大院・農工総合)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A13p06　大麦若葉末の摂取がヒト腸内細菌叢に与える影響の解析
15:05　○須谷尚史[1]，草場宣廷[2]，眞志喜桜[2]，鍔田仁人[2]，古俣麻希子[3]，立花広太[3]，白髭克彦[1]　([1]東京大学，[2]㈱東洋新薬，[3]TAK-Circulator㈱)

2A13p07　青汁専用大麦若葉「むぎおう」の乳酸菌増殖活性成分の探索
15:16　○神谷智康，鍔田仁人，青木幸久，永瀧達大　(株式会社大地の力研究所)

2A13p08　*Lactobacillus rhamnosus* GG 株の摂取が健常成人の排便および肌状態に及ぼす影響
15:27　○宮澤賢司，原田　岳，依田一豊，山崎和幸，何　方，平松　優　(タカナシ乳業㈱・商品研究所)

2A13p09　*Lactobacillus rhamnosus* GG 株の摂取が健常成人の腸内および皮膚フローラに及ぼす影響
15:38　○原田　岳，宮澤賢司，依田一豊，山崎和幸，何　方，平松　優　(タカナシ乳業)

2A13p10　Screening for infection inhibitors of human norovirus GII.17 from food ingredients
15:49　○Li Li[1], Tomoki Shojima[1], Yi Lu[1], Yukie Katayama[1], Michio Suzuki[1], Hiroshi Kawakami[2], Koji Nagata[1]（[1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoritsu Women's Univ.）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A13p11　わかめの摂取がヒトの便通と腸内環境に与える影響
16:10　○吉永恵子[1], 村上　桂[1], 丸谷礼子[2], 小池田崇史[3], 仲野隆久[1]（[1]理研ビタミン㈱, [2]㈱SOUKEN, [3]芝パレスクリニック）

2A13p12　加熱処理乳酸菌素材「FK-23」の摂取が便秘傾向にある健常人の便通に与える影響
16:21　○林　篤志[1], 坪内芙美香[1], 岡森万理子[1], 嶋田貴志[1], 杉野友啓[2]（[1]ニチニチ製薬株式会社, [2]株式会社 総合医科学研究所）

2A13p13　ダイズ難消化性タンパク質の腸管バリア増強効果
16:32　○荻田　佑[1], 上野　豊[2], 梅澤公二[1], 石黒貴寛[3], 下里剛士[1,4]（[1]信州大バイオメディカル研, [2]信州大農, [3]旭松食品㈱研究所, [4]信州大菌類微生物セ）

2A13p14　時間栄養学的解析による水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響
16:43　○千々岩樹佳[1,2], 丸山　徹[1,2], 細川正人[3,4], 柴田重信[5], 竹山春子[1,2,3]（[1]早大・先進理工・生医, [2]産総研・早大CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ, [5]早大・先進理工・電生）

2A13p15　高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与が回腸遺伝子発現に及ぼす効果
16:54　○篠崎文夏[1], 亀井飛鳥[1], 嶋田耕育[1], 安岡顕人[1], 荒井綜一[1,2], 阿部啓子[1,3]（[1]KISTEC, [2]東農大総研, [3]東大院農）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A13p16　コラーゲン由来トリペプチド X-Hyp-Gly による骨芽細胞分化促進作用
17:15　○多賀祐喜[1], 楠畑　雅[1], 後藤希代子[1], 服部俊治[1], 船戸紀子[2]（[1]ニッピ・バイオマトリックス研究所, [2]東京医科歯科大学）

2A13p17　カルノシン酸は heme oxyganase-1 を誘導し軟骨変性を抑制する
17:26　○石飛博之[1,2], 真田洋平[3], 加藤義雄[4], 生田祥也[2], 柴田紗知[5], 松原主典[5], 安達伸生[2], 味八木茂[2,3]（[1]京都産業大現代社会, [2]広島大院整形, [3]広島大病院, [4]産総研, [5]広島大院教育）

2A13p18　マルトビオン酸は破骨細胞分化を抑制する
17:37　○西尾彩花[1], 鵜飼容子[2], 山口青夏[2], 渡辺章夫[3], 米澤貴之[3], 禹　済泰[1], 末廣大樹[4], 阿部秀飛[4], 深見　健[4], 大西素子[1,2]（[1]中部大・応生化, [2]中部大院・応生, [3]中部大・生機研, [4]サンエイ糖化㈱）

2A13p19　骨芽細胞分化に対するブラジル産グリーンプロポリス由来化合物の作用
17:48　○小川ゆり[1], 渡辺章夫[2], 出口有佑[3], 川上俊成[3], 遠藤ゆき[1], バストスジャイロケヌップ[4], 米澤貴之[2], 禹　済泰[1]（[1]中部大応生, [2]中部大生機研, [3]中部大応生院, [4]サンパウロ大）

2A13p20　老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護機構及び関節軟骨保護効果の検討
17:59　○奥田真友美[1], 柴田紗知[2], 味八木茂[3], 大久保剛[4], 伊豆英恵[5], 藤井　力[5,6], 松原主典[1]（[1]広島大院・教育, [2]福山大・生命工学, [3]広島大病院・未来医療センター, [4]仙台白百合女大・健康栄養, [5]酒総研, [6]広島大院・生物圏）

A14 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A14a01　Synthesis of 3-O-methylcyanidin and the stability of 3-O-substition of cyanidins
9:00　○Asmaa benyamin EL-Meligy[1,2], Takehiro Ishihara[1], Kin-ichi Oyama[3], Ahmed Mahmoud El-Nahas[2], Kumi Yoshida[1]（[1]Graduate School of Informatics, Nagoya University., [2]Faculty of Science, El-Menoufia University, Egypt., [3]Research Institute for Materials Science, Nagoya University.）

2A14a02　プラディミシンと高マンノース型糖鎖のオリゴ糖モチーフとの結合解析
9:11　○渡邉泰典[1], 中川　優[1,2], 山地史哉[1], 五十嵐康弘[3], 伊藤幸成[2], 小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農, [2]理研, [3]富山県大・生工）

2A14a03　Quinocidin のアナログ合成と細胞毒性評価
9:22　○澤木裕紀，中川　優，小鹿　一（名大院・生命農）

2A14a04　Kujigamberol 酸化誘導体の調製と活性評価
9:33　○高橋穂乃香[1], 下田　希[2], 丸山美紅[1], 越野広雪[3], 大野美紗[2], 木村賢一[1,2]（[1]岩手大院総合科学, [2]岩手大農, [3]理研CSRS）

2A14a05　スピロ環をもたない aplysiatoxin 単純化アナログの合成 , 配座 , および活性
9:44　○芦田能基[1], 柳田　亮[2], 川浪康弘[2], 入江一浩[3]（[1]愛媛大院連合農, [2]香川大農, [3]京大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A14a06　担子菌類 *Coprinopsis cinerea* からの新規骨格を有する 2 種のノルセスキテルペノイド
10:05　○大高潤之介，二村友史，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A14a07　*Pyricularia oryzae* におけるテヌアゾン酸生産誘導化合物の探索と作用機構解析
10:16　○本山高幸，田中陽子，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A14a08　*Tolypocladium album* における NPD938 による二次代謝産物生合成遺伝子の発現誘導機構
10:27　○石井友彬[1,2], 本山高幸[1], 鎌倉高志[2], 長田裕之[1]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー, [2]東理大理工・応生）

2A14a09　遊離脂肪酸による PI3K/Akt パスウェイ不活性化のメカニズム解析
10:38　○長澤侑海，田代　悦，井本正哉（慶應大理工）

2A14a10　シスプラチンによる TGF-β シグナル活性化を介した EMT 誘導
10:49　○田代　悦，今辻沙也佳，井本正哉（慶應大理工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A14a11　*Candida albicans* に菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A のケミカルバイオロジー研究
11:10　○山本甲斐[1,2], 二村友史[1], 清水　猛[1], 長田裕之[1,2]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー, [2]埼玉大学）

2A14a12　糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 より単離した新規デカリン骨格含有二次代謝産物 wakodecaline C の構造
11:21　○野川俊彦[1], 加藤直樹[2], 清水　猛[1], 岡野亜紀子[1], 二村友史[1], 高橋俊二[2], 長田裕之[1]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー, [2]理研CSRS・天然物生合成）

2A14a13　新規アントラキノン kinanthraquinone の同定と生物活性評価
11:32　○高木　海[1], 野川俊彦[2], 二村友史[2], 長田裕之[2], 高橋俊二[1]（[1]理研CSRS・天然物生合成ユニット, [2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A14a14　去勢抵抗性前立腺がん選択的な細胞死誘導物質の活性評価
11:43　○濱村祐輝[1]，小坂威雄[2]，田代　悦[1]，大家基嗣[2]，井本正哉[1]（[1]慶大理工，[2]慶大医）

2A14a15　耐熱性放線菌が生産する熱ショック代謝物（HSM）の研究
11:54　○加藤　航，齋藤　駿，田代　悦，井本正哉（慶大院・理工）

A15 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A15a01　破骨細胞分化に対するブラジル産グリーンプロポリス由来化合物の作用
9:00　○出口有佑[1]，川上俊成[1]，小川ゆり[2]，遠藤ゆき[2]，渡辺章夫[3]，バストスジャイロケヌップ[4]，米澤貴之[3]，禹　済泰[2]（[1]中部大応生院，[2]中部大応生，[3]中部大生機研，[4]サンパウロ大）

2A15a02　Stylissatin A の抗炎症及び抗肥満活性に関する研究
9:11　○張　夢華[1]，砂場大輝[2]，木越英夫[2]，北　将樹[3]（[1]筑波大グローバル教育院，[2]筑波大院数理物質，[3]名大院生命農）

2A15a03　3,5-ジガロイル化フラバン-3-オール誘導体をリード化合物とした構造-活性相関研究
9:22　村上　誠[1]，○道下　僚[2]，小川明日華[2]，西野祐樹[2]，辻　一成[2]，花岡裕也[2]，法島太一[1]，西村拓哉[1]，東野雄祐[1]，濱田義知[1]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工・先端，[2]大阪電通大・工・環境）

2A15a04　アミロイド β42 の毒性オリゴマーの細胞内標的探索
9:33　○片岡翔太郎[1]，村上一馬[1]，徳田真樹[1]，泉　俊輔[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]広大院理）

2A15a05　アミロイド β42 の毒性 2 量体モデルから形成されるプロトフィブリルを標的とした RNA アプタマーの開発
9:44　○小畑弥生，村上一馬，関川あさ，入江一浩（京都大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A15a06　青枯病の化学防除を志向したクオラムクエンチング剤の開発
10:05　○吉原彩華，嶋谷美香，甲斐建次（阪府大院・生命環境）

2A15a07　青枯病菌の 3-OH PAME 型クオラムセンシング機構を阻害するアンタゴニストの創製
10:16　○坂田　恵，吉原彩華，甲斐建次（阪府大院・生命環境）

2A15a08　アプリシアトキシン単純化アナログ・10-Methyl-Aplog-1 の側鎖誘導体の合成と活性
10:27　○高田晃児[1]，花木祐輔[1]，菊森将之[1]，徳田春邦[1]，柳田　亮[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農）

2A15a09　抗腫瘍性 Aplysiatoxin 誘導体・10-Me-Aplog-1 のアセタール型アナログの合成と生物活性
10:38　○早川皓太郎[1]，花木祐輔[1]，徳田春邦[1]，柳田　亮[2]，中川　優[3]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農，[3]名大院生命農）

2A15a10　Aplysiatoxin 単純化アナログ・10-methyl-aplog-1 のがん細胞増殖抑制に関わる PKC アイソザイムの同定
10:49　○花木祐輔[1]，四方雄貴[2]，菊森将之[1]，堀田夏紀[1]，井本正哉[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]慶大理工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A15a11　Bacillus cereus が産生する環状ドデカデプシペプチド，ホモセレウリドの合成と生物活性の検討
11:10　○奈賀俊人[1,3]，服部能英[2]，竹中宏誌[2]，大田洋一郎[2]，切畑光統[2]，谷森紳治[3]（[1]東食短大包装食品工学，[2]阪府大BNCT研究センター，[3]阪府大院生命環境）

2A15a12　アミロイド β の凝集を阻害する β-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成
11:21　○田中郁也，柴田果奈，増田裕一（三重大生物資源）

2A15a13　環状ペプチド PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類の全合成と生物活性評価
11:32　○本田将也，増田裕一（三重大生物資源）

2A15a14　アポモルフィンによるアミロイド β42 凝集抑制機構の解析
11:43　○花木瑞穂[1]，村上一馬[1]，片山寿美枝[2]，赤木謙一[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]医薬基盤研）

2A15a15　青ジソに含まれるアミロイド β42 の凝集阻害物質の作用機構とマウスにおける生体内代謝
11:54　○坂口嘉紀[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，泉尾直孝[2]，小澤裕介[2]，粟野達也[3]，高部圭司[3]，川瀬泰司[4]，廣瀬賢治[4]，三羽伸明[5]，久米利明[5]，清水孝彦[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農食品，[2]千葉大院医，[3]京大院農森林，[4]ウォーターズ，[5]京大院薬）

A16 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A16a01　9-Anthracenyl 基導入型フルオラス GH 2nd 触媒の合成と閉環メタセシス反応
9:00　○五十嵐里奈，下脇健斗，小林佑基，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

2A16a02　固相-液相間移動型フルオラス有機分子触媒の開発：スルホンアミドを有するミディアムフルオラスプロリン触媒の合成，及び移動能の確認
9:11　○後藤万智子，杉山祐也，枝川静華，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

2A16a03　Emericellamide A のフルオラスミクスチャー合成：立体異性体のフラグメント合成
9:22　○白井竜平，伊藤聖人，小栗一真，杉山祐也，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

2A16a04　キノリンから誘導したアライン中間体による環化付加反応
9:33　○小玉彩友美，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

2A16a05　ビニロガス向山アルドール反応を利用したブテノリド骨格の構築
9:44　○森口舞子，久世雅樹，滝川浩郷（神戸院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A16a06　ラプチンドール A の全合成研究
10:05　○中野広暁[1]，神谷真鈴[2]，菅　敏幸[2]，江木正浩[1,2]（[1]静岡県大食，[2]静岡県大薬）

2A16a07　スチリルクマリン類の合成および構造活性相関
10:16　○柳川達哉[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

2A16a08　海洋環形動物より単離された Thelepamide の合成研究
10:27　○小出祐実，井田浩介，泉　実，清田洋正（岡山大院・環境生命）

2A16a09　抗腫瘍物質 Sanctolide A の合成研究
10:38　○清田洋正，田中善將，平田智大，長尾実佳，泉　実（岡山大学・環境生命）

2A16a10　アミロイド線維形成を阻害するアシル化キナ酸類の合成第二法
10:49　○石原健広[1]，尾山公一[2]，重光佳基[3]，天野名都子[3]，廣明秀一[3]，近藤忠雄[4]，吉田久美[4]（[1]名大院情報科学，[2]名大物国セ，[3]名大院創薬，[4]名大院情報学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A16a11　Oscillatoxin D と Aplysiatoxin の統一的合成法の開発
11:10　○新木悠介，野倉吉彦，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

2A16a12　セスペンドールの合成研究
11:21　○小野義貴，植木佳織，JITTRA Suthiwong，西川俊夫（名大院生命農）

2A16a13　計算化学的手法によるホルモサリド A の構造推定
11:32　○占部大介　（富山県大工）

2A16a14　腎線維化抑制活性を有する Cochlearol A の合成研究
11:43　○鳴瀬和美[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]，渡邉秀典[1]，石神　健[2]　（[1]東大院農生科・応生化，[2]東農大・生命）

2A16a15　Neurymenolide A の合成研究
11:54　○増田眞大，村瀬哲司，桜井なつ樹，渡邉秀典　（東大院農生科・応生化）

A16 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A16p01　ホモイソフラボノイドの合成および生理活性の検討
14:00　○金田　匡[1]，川井　悟[2]，吉澤結子[3]，常盤野哲生[3]　（[1]秋田県立大生資科院，[2]東電大理工，[3]秋田県立大生資科）

2A16p02　酵素による不斉還元を鍵段階とする，海産天然物 Hamigeran B の合成研究
14:11　○須貝　威，桑田和明，藤田理愛，花屋賢悟，東林修平　（慶應大薬）

2A16p03　2,4-dimethyl-3,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran の立体異性体の合成
14:22　○田窪竜明[1]，西脇　寿[2]，山内　聡[2]　（[1]愛媛大，[2]愛媛大院農）

2A16p04　ガロカテキンユニット有するフラバン-3-オール 2 量体の構造-活性相関研究
14:33　○濱田義知[1]，中島範行[2]，齊藤安貴子[1]　（[1]大阪電通大院工，[2]富山県立大工）

2A16p05　芳香族有機酸を有するアシル化アントシアニンの合成研究
14:44　○柴　康太[1]，尾山公一[2]，近藤忠雄[1]，吉田久美[1]　（[1]名大院情報学，[2]名大物国セ）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A16p06　アントシアニン類の活性酸素種消去 メカニズムに関する研究
15:05　○佐竹竜弥，柳瀬笑子　（岐阜大）

2A16p07　赤米色素ポリフェノールの貯蔵中における化学変化に関する研究
15:16　○日比啓秀，柳瀬笑子　（岐阜大応生）

2A16p08　Epigallocatechin oligomer の合成と抗腫瘍活性評価
15:27　○山本慎也[1]，　市川幹広[1]，　石原知里[5]，　野々部修平[3]，梅澤公二[2,5]，　服部恭尚[4]，　藤井　博[2,5]，　真壁秀文[1,2]　（[1]信州大院総合理工農，[2]信州大バイオメディカル研究所，[3]信州大農，[4]京都薬科大共同利用機器，[5]信州大院総合理工生命医工）

2A16p09　ビス-トリクロロアセトイミダートの分子内環化を用いた *epi*-サイトキサゾン 1 の効率的合成
15:38　○石川　萌，柴崎里菜，野島結貴，松島芳隆　（東京農業大学・生物応用化学科）

2A16p10　除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの合成研究
15:49　○中村皓毅，近藤弘史，寺澤慶彦，松島芳隆　（東京農業大学・生物応用化学科）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A16p11　オキシム中間体を経由したピリジン合成法の開発：Anibamine の合成研究
16:10　○宮腰　建，今野博行　（山形大院理工）

2A16p12　Callipeltin Q の合成研究
16:21　○東海林由憲，今野博行　（山形大院理工）

2A16p13　Lantibiotic peptide SapB の固相全合成研究
16:32　似内郁美，○今野博行　（山形大院理工）

2A16p14　海綿動物由来環状ペプチド Nazumazole C の構成フラグメント合成
16:43　○川島麻友美，　田中悠太郎，　鷹觜千佳，　石原稿太朗，松儀真人，塩入孝之　（名城大農）

2A16p15　ヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチドの構造活性相関に向けた類縁体合成
16:54　○片山秀和[1]，中村啓太郎[1]，三田雅敏[2]　（[1]東海大工・生命化学，[2]東京学芸大教育・生物）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A16p16　皮膚バリアの重要分子，不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成
17:15　○村井勇太[1]，小川　連[2]，端野翔太[2]，門出健次[1]　（[1]北大先端生命，[2]北大生命科学院）

2A16p17　*p*-トルオイル基を利用した 3-デオキシ-ソホロース誘導体の効率的合成
17:26　○田中信清[1,2]，中島将博[1]，今場司朗[2]　（[1]東理大院理工，[2]農研機構）

2A16p18　アザヌクレオシドの立体選択的合成
17:37　○石井聖華，岡本一央，千葉一裕　（東農工大）

2A16p19　プロリン触媒下塩基によるインダゾロンの簡便合成
17:48　○谷森紳治，辻井美穂，園田素啓　（阪府大院生環）

2A16p20　ɣ-Carboline 誘導体の簡便な合成法の開発
17:59　○三好康平，園田素啓，谷森伸治　（阪府大院生命環境）

A17 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A17a01　コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）が産生するフェアリー化合物の生合成酵素遺伝子群の探索
9:00　○伊藤彰将[1]，竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2]，鈴木智大[3]，道羅英夫[2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,6]　（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]宇都宮大・バイオ，[4]東海大・創造，[5]静県大・薬，[6]静大院・創造）

2A17a02　フェアリー化合物 2-azahypoxanthine のコムラサキシメジにおける生合成研究
9:11　○古田島美颯[1]，　崔　宰熏[1,2]，　道羅英夫[2]，　鈴木智大[3]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,6]　（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]宇都宮大・バイオ，[4]東海大・創造，[5]静県大・薬，[6]静大院・創造）

2A17a03　冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における 3'-amino-3'-deoxyadenosine の生合成経路の解析
9:22　○天内優子[1]，崔　宰熏[1,2]，恒松雄太[3]，渡辺賢二[3]，道羅英夫[2]，鈴木智大[4]，平井浩文[1,5]，河岸洋和[1,2,5]　（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]宇都宮大・バイオ，[5]静大院・創造）

2A17a04　CRISPR/Cas9 System を用いた cyclochlorotine の生合成研究
9:33　叶　　英[1]，○劉　成偉[1]，尾崎太郎[1]，南　篤志[1]，丸山潤一[2]，及川英秋[1]　（[1]北大院理，[2]東大院・農生科・応生工）

2A17a05　糸状菌が生産するインドールセスキテルペンの生合成研究（3）
9:44　○工藤洸星[1]，松本知之[1]，劉　成偉[2]，尾崎太郎[2]，五味勝也[3]，南　篤志[2]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A17a06　イネにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する生化学的な研究
10:05　○竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，稲井　誠[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,5]　（[1]静岡大院・農，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡県立大・薬，[4]東海大・創造，[5]静岡大院・創造）

2A17a07　コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質の代謝産物に関する化学的研究
10:16　○與五澤薫[1]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，稲井　誠[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,5]　（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静岡県大・薬，[4]東海大・創造，[5]静大院・創造）

2A17a08　イネにおけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine（AHX）及び 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）の配糖化に関与する糖転移酵素に関する化学的研究
10:27 ○崔　宰熏[1,2], 近藤遼一[1], 平井浩文[1,2], 浅川倫宏[3], 稲井　誠[4], 菅　敏幸[4], 河岸洋和[1,2,5]（[1]静大院・総合農, [2]静大・グリーン研, [3]東海大・創造, [4]静岡県大・薬, [5]静大院・創造）

2A17a09　トウガラシ属植物におけるカプシノイド生合成とエンドファイトの関連
10:38 ○神戸　豪, 金島一樹, 中谷祥恵, 古旗賢二（城西大薬）

2A17a10　ササユリ（*Lilium japonicum*）の二次代謝産物分析
10:49 ○藤澤瑞希[1], 松川哲也[1], 瀧川義浩[5], 荒井　滋[2], 柳川　綾[4], 秋野順治[3], 梶山慎一郎[1]（[1]近畿大学生物理工, [2]大神神社, [3]京都工繊大・CBFS, [4]京都大学・RISH, [5]近畿大学先端研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A17a11　イネにおけるイソペンチルアミンの生合成
11:10 ○網干貴子[1], 飯塚千晶[1], 寺石政義[2], 奥本　裕[2], 森　直樹[2], 村山哲也[1]（[1]山形大農, [2]京大院農）

2A17a12　異種発現によるバナナ病原菌由来ジテルペン類の生合成研究
11:21 ○田澤聡大[1], 叶　　英[2], 尾﨑太郎[2], 劉　成偉[2], 南　篤志[2], 小笠原泰志[3], 大利　徹[3], 及川英秋[2]（[1]北大理, [2]北大院理, [3]北大院工）

2A17a13　病原性糸状菌が感染時特異的に生産するセスキテルペンの生合成研究
11:32 ○瀧野純矢[1], 南　篤志[2], 尾﨑太郎[2], 劉　成偉[2], 白須　賢[3], 及川英秋[2]（[1]北大理, [2]北大院理, [3]理研CSRS）

2A17a14　麹菌異種発現系を用いたコニジオゲノンの異種生産
11:43 ○椎名哲也[1], 尾﨑太郎[2], 劉　成偉[2], 越野広雪[3], 南　篤志[2], 及川英秋[2]（[1]北大理, [2]北大院理, [3]理研CSRS）

2A17a15　立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 ファミリー Diels-Alderase の機能解析
11:54 ○加藤直樹[1], 野川俊彦[2], 衣笠清美[1], 高橋俊二[1], 長田裕之[2]（[1]理研CSRS・天然物生合成, [2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

A17 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A17p01　糸状菌が生産する cyclohelminthol 類の生合成研究
14:00 ○鵜飼孝大[1], 南　篤志[2], 田中静也[3], 劉　成偉[2], 尾﨑太郎[2], 橋本　勝[3], 及川英秋[2]（[1]北大院総化, [2]北大院理, [3]弘大院農）

2A17p02　糸状菌アントラキノン系ポリケタイドの生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析
14:11 ○深谷充功[1], 南　篤志[2], 尾﨑太郎[2], 劉　成緯[2], 丸山潤一[3], 及川英秋[2]（[1]北大理, [2]北大院理, [3]東大院農）

2A17p03　ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた糸状菌天然物の異種生産
14:22 ○佐藤優哉[1], 瀧野純矢[2], 椎名哲也[2], 鵜飼孝大[1], 南　篤志[3], 尾﨑太郎[3], 劉　成緯[3], 藤井　勲[4], 丸山潤一[5], 及川英秋[3]（[1]北大院総化, [2]北大理, [3]北大院理, [4]岩手医科大薬, [5]東大院農）

2A17p04　カテキンのプロオキシダント効果：キノン代謝を経由する活性酸素毒性の解析
14:33 水野美麗, 阿部眞優奈, 生澤瑞希, ○福原　潔（昭和大薬）

2A17p05　昆虫におけるインドール酢酸生合成の機構に関する研究
14:44 ○武井麻美[1,2], 小暮奨太[1], 横山千晃[1], 上妻由章[1], 鈴木義人[1]（[1]茨城大・農, [2]東京農工大・連合農学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A17p06　原核生物由来テルペン合成酵素の探索と解析
15:05 ○村井恵一[1], 新家一男[2], 西山　真[1], 葛山智久[1]（[1]東大・生物生産工学セ, [2]産総研）

2A17p07　*Trichoderma* 属糸状菌由来 Brasilane 型セスキテルペン合成酵素の機能解析
15:16 ○寺本和矢[1], 野中健一[2], 塩見和朗[2], 西山　真[1], 葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ, [2]北里大・生命研）

2A17p08　大腸菌を宿主とした Ergothioneine の発酵生産
15:27 大澤　怜[1], 上出倫敬[1], ○佐藤康治[2], 河野祐介[3], 大津厳生[3], 大利　徹[2]（[1]北大院総合化学, [2]北大院工, [3]筑波大）

2A17p09　多価不飽和脂肪酸合成酵素における 3-ケトアシルリダクターゼとデヒドラターゼの機能解析
15:38 ○林　祥平[1], 佐藤康治[2], 小笠原泰志[2], 氏原哲朗[3], 大利　徹[2]（[1]北大院総合化学, [2]北大院工, [3]協和発酵バイオ）

2A17p10　放線菌由来アルカロイド SB-203208 の生合成研究
15:49 ○淡川孝義[1], 胡　志娟[1,2], 阿部郁朗[1]（[1]東大薬, [2]浙江大海洋）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A17p11　ペプチジルヌクレオシド系抗生物質 Amipurimycin の生合成に関する研究
16:10 ○池内秀雄[1], 白石太郎[1], 新家一男[2], 西山　真[1], 葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ, [2]産総研）

2A17p12　新規 thioviridamide 類縁体の創出と生合成酵素の機能解析
16:21 ○工藤　慧[1], 小岩井花恵[3], 新家一男[2], 池田治生[3], 西山　真[1], 葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ, [2]産総研, [3]北里大・北里生命研）

2A17p13　streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した amino-acyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の基質特異性解析
16:32 ○松田貫暉[1], 丸山千登勢[1], 後藤佑樹[2], 橋本順子[3], 新家一男[4], 菅　裕明[2], 濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源, [2]東大院・理, [3]JBIC, [4]産総研）

2A17p14　抗生物質 SF-2111B における *O*-acylpeptide 生合成遺伝子の機能解析
16:43 ○新倉春香[1], 丸山千登勢[1], 坂上莉奈[1], 橋本絢子[2], 新家一男[3], 濱野吉十[1]（[1]福井県大院・生物資源, [2]JBIC, [3]産総研）

2A17p15　環状ペプチド化合物 Q6402 における methyl-cyclopropane 環生合成機構
16:54 ○茅根千湖[1], 丸山千登勢[1], 橋本絢子[2], 小曽根郁子[2], 新家一男[3], 濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源, [2]JBIC, [3]産総研）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A17p16　ficellomycin 生合成におけるアザビシクロ環の修飾機構に関する研究
17:15 ○黒澤　菫, 松田研一, 長谷部文人, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大・生物工学セ）

2A17p17　Studies on Secondary Metabolic Pathway Mediated by Type II Amino-group Carrier Protein in *Streptomyces* sp.
17:26 ○Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi Matsuda[1], Takeo Tomita[1], Kazuo Shin-ya[2], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1]（[1]BRC UTokyo, [2]AIST）

2A17p18　新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索
17:37 ○清水庸平, 佐藤洋平, 小笠原泰志, 大利　徹（北大院工）

2A17p19　ポリグルタミン酸生合成の解析
17:48 重松真由子, ○小笠原泰志, 大利　徹（北大院工）

2A17p20　新規 labionen 構造の形成に関与する lanthipeptide 合成酵素の解析
17:59 ○菅井佳宣[1], 江畑一真[1], 浅水俊平[1], 後藤佑樹[2], 菅　裕明[2], 尾仲宏康[1]（[1]東大院農, [2]東大院理）

A18 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A18a01　白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）由来の生理活性物質の探索
9:00　○碓井梓美[1]，呉　　静[2]，道羅英夫[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2A18a02　オオシロカラカサタケ由来の機能性物質の探索
9:11　○大浦　健[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2A18a03　Isolation of Biologically Functional Compounds from *Tricholoma matsutake*
9:22　○Lisa FAHRUNNISSA[1]，Kazuki UCHIDA[1]，Jing WU[2]，Jae-Hoon CHOI[1,2]，Hirofumi HIRAI[1,2]，Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3]　([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

2A18a04　Cyclohelminthol X の単離・構造
9:33　○橋本　勝[1]，田中静也[1]，福士江里[2]　([1]弘前大農生，[2]北大院農)

2A18a05　Cyclohelminthol Y の構造
9:44　○田中静也，橋本　勝　(弘前大学)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A18a06　高等菌類の子実体形成物質の探索
10:05　○呉　　静[1]，　内田和輝[2]，　崔　宰熏[1,2]，　平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大・グリーン研，[2]静大院・総合農，[3]静大院・創造)

2A18a07　ヤマブシタケ胞子（*Hericium erinaceus*）由来の生体機能物質の探索
10:16　○石岡達朗[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2]，　平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2A18a08　イネ紋枯病菌によるフィトアレキシン代謝産物の構造決定及び抗菌活性
10:27　○勝間田駿，隠塚修平，戸嶋浩明，長谷川守文　(茨城大農)

2A18a09　黒穂菌（*Ustilago esculenta*）由来植物成長調節物質に関する化学的研究
10:38　○森　拓未[1]，西山祐貴[1]，呉　　静[4]，崔　宰熏[3,4]，徳山真治[3]，平井浩文[3,4]，河岸洋和[2,3,4]　([1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大農・応生化，[4]静大・グリーン研)

2A18a10　ナラタケ属が産生する生物活性物質に関する化学的研究
10:49　○上石優作[1]，森　拓未[3]，関谷　敦[4]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2]　([1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・総合農，[4]森林総研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A18a11　海洋生物における新規テトロドトキシン関連化合物の探索
11:10　○上山　望，杉本敬太，長由扶子，此木敬一，山下まり　(東北大院農)

2A18a12　記憶喪失性貝毒ドウモイ酸の生合成経路に関する研究
11:21　○前野優香理[1]，小瀧裕一[2]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，山下まり[1]　([1]東北大院農，[2]福島学院大学)

2A18a13　ムレオオフウセンタケ由来の生体機能性物質の探索
11:32　○高橋真奈美[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2,3]，　平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]　([1]静大農・応生化，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

2A18a14　Isolation of Bioactive Compounds from *Leucopaxillus giganteus*
11:43　○Irine Yunhafita Malya[1]，Jing Wu[2]，Etsuko Harada[3]，Jae-Hoon Choi[2]，Hirofumi Hirai[2]，Hirokazu Kawagishi[1,2]　([1]Grad. Sch. of Dci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, Japan)

2A18a15　Bioorganic chemicals studies on the edible mushroom *Cortinarius caperatus*
11:54　○Arif Yanuaru RIDWAN[1]，Jing WU[2]，Jae-Hoon CHOI[2]，Hirofumi HIRAI[1,2]，　Hirokazu KAWAGISHI[1,2]　([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

A19 会場　午前の部（9:00〜11:54）

有機化学，天然物化学―農薬/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A19a01　動物細胞 HEK293T を使った昆虫ホルモンアゴニストの活性評価系
9:00　○名部　拓[1]，林謙一郎[2]，石塚千遥[1]，原島小夜子[3]，八木孝司[3]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]　([1]京大院・農，[2]阪大院・医，[3]大府大院・理)

2A19a02　植物寄生性線虫の生体アミン受容体の単離と解析
9:11　○光増可奈子，澤進一郎，太田広人　(熊大院先端科学)

2A19a03　昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo と阻害化合物の生化学的・構造生物学的解析：新規農薬開発に向けて
9:22　○稲葉和恵[1]，小祝孝太郎[2]，諸橋香奈[1]，塩谷　天[1]，荒井怜奈[3]，小島宏建[4]，岡部隆義[4]，長野哲雄[4]，井上英史[5]，藤川雄太[5]，湯本史明[2]，千田俊哉[2]，丹羽隆介[6]　([1]筑波大院・生命環境，[2]高エネ研・物構研・構造生物，[3]筑波大・生命環境学群，[4]東大・創薬機構，[5]東京薬大・生命科学，[6]筑波大・生命環境)

2A19a04　γ-BHC 骨格にフッ素原子あるいは塩素原子を付加した化合物の殺虫活性および GABA アンタゴニスト活性
9:33　○田中啓司[1]，岩井崇晃[1]，坂本賢昭[1]，尾添嘉久[2]，赤松美紀[3]，松田一彦[1]　([1]近畿大農，[2]島根大生物資源，[3]京大院農)

2A19a05　植物の気孔密度を制御するペプチドホルモン stomagen のミミックペプチドの合成と構造活性相関
9:44　○植田健太，近藤竜彦，小鹿　一　(名大院・生命農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A19a06　近赤外生物発光材料の生体内イメージングにおける有用性
10:05　○北田昇雄[1]，木山正啓[1]，齊藤亮平[1]，岩野　智[2]，丹羽治樹[1]，平野　誉[1]，牧昌次郎[1]　([1]電通大，[2]理研)

2A19a07　結晶スポンジ法によるビール苦味成分酸化物の相対および絶対立体構造決定
10:16　○谷口慈将[1,2,3]，　菊池　貴[4]，　藤田　誠[1,2]　([1]東大院工，[2]JST-ACCEL，[3]キリン基盤研，[4]リガク応技センター)

2A19a08　オジギソウ根粒菌 *Cupriavidus taiwanensis* における青枯病菌型とコレラ菌型クオラムセンシング機構の機能解析
10:27　○脇本隆行，谷　修治，甲斐建次　(阪府大院・生命環境)

2A19a09　イネ（*Oryza sativa*）に対する酢酸処理による乾燥耐性付与に伴う代謝変化
10:38　○伊左治俊策[1]，吉永直子[1]，土生芳樹[2]，森　直樹[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]農研機構)

2A19a10　ビール酵母由来の多糖によるイネ（*Oryza Sativa*）の根張り向上効果とイオン吸収能の変化
10:49　○持田真歩，中道貴也，森田智也，吉永直子，落合久美子，小林　優，奥本　裕，寺石政義，森　直樹　(京大農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A19a11　インドネシアのハリナシバチが生産するプロポリスの化学的研究
11:10　○宮田　椋[1]，Muhamad Sahlan[2]，熊澤茂則[1]　([1]静岡県立大食品栄養，[2]インドネシア大)

2A19a12　タイのハリナシバチが生産するプロポリスの化学的研究
11:21 ○石津英里子[1], BOONYADIST Vongsak[2], 熊澤茂則[1]（[1]静岡県立大学, [2]Burapha University）

2A19a13　匂い可視化技術の開発
11:32 ○亀山　裕, 矢吹雅之, 井上道晶（花王株式会社）

2A19a14　画像解析を用いたダイズのハスモンヨトウ食害抵抗性因子の探索
11:43 ○中田　隆[1], 手嶋　伸[1], 吉永直子[1], 寺石政義[1], Eric SCHMELZ[2], 奥本　裕[1], 森　直樹[1]（[1]京大院農, [2]カリフォルニア大学サンディエゴ校）

A19 会場　午後の部（14:00〜14:55）

有機化学，天然物化学―その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A19p01　ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の化学合成とチロシナーゼ阻害活性
14:00 ○田中優理, 鈴木茉莉那, 小太刀悠佳, 二瓶賢一（宇都宮大農）

2A19p02　アピオスイソフラボン配糖体の全合成とそのチロシナーゼ阻害活性
14:11 ○馬酔木奈々, 二瓶賢一（宇都宮大農）

2A19p03　エピロドデンドリンをリード分子とした新しいチロシナーゼ阻害剤の化学的探索
14:22 ○石岡和佳奈[1], 大貫沙弥香[1], 岩舘丈央[2], 二瓶賢一[1,2]（[1]宇都宮大農, [2]農工大院連農）

2A19p04　スチルベン類の合成及び構造活性相関に関する研究
14:33 ○阿部圭祐[1], 川井　悟[1], 常盤野哲生[2], 吉澤結子[2]（[1]東電大理工, [2]秋田県大生資科）

2A19p05　6 位に 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を持つ 5,6-dihydro-*α*-pyrone の全立体異性体の合成と抗微生物活性
14:44 ○越智良太[1], 秋山浩一[2], 阿野嘉孝[1], 西脇　寿[1], 山内　聡[1]（[1]愛媛大院, [2]愛媛大学学術支援センター）

A20 会場　午前の部（9:00〜11:54）

生物科学―糖鎖科学 - 糖鎖工学―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A20a01　新規迅速多糖合成法によるポリラクトサミンの合成
9:00 ○浅野拓也[1], 今村彰宏[1], 石田秀治[1,2]（[1]岐阜大院・応用生物, [2]岐阜大・G-CHAIN）

2A20a02　稀少アミノ糖 Fuc4NAc を含む *Stenotorophomonas maltophilia* 由来 O 抗原糖鎖の合成研究
9:11 ○中田えりな[1], 今村彰宏[1], 石田秀治[1,2], 安藤弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]岐阜大・G-CHAIN）

2A20a03　*N,N*-ジアセチル基を利用した MPM 保護シアリルグリコシドの調製研究
9:22 ○伊藤　駿, 朝比奈雄也, 北條裕信（阪大蛋白研）

2A20a04　*O*-beta-*N*-アセチルグルコサミンを持つヒストン H2A の化学合成
9:33 ○朝比奈雄也, 川上　徹, 北條裕信（阪大蛋白研）

2A20a05　アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響
9:44 ○伊藤　博[1], 小林厚志[1,2], PICHIERRI Fabio[3]（[1]日大工, [2]日大工・工学研究所・生物境界面の機能工学プロジェクト, [3]東北大院工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A20a06　リゾチーム活性測定用基質の設計と合成
10:05 ○松井　萌[1], 河野はるか[1], 松﨑優香[1], 加藤優奈[1], 碓氷泰市[2], 尾形　慎[1]（[1]福島高専・ITS, [2]静岡大）

2A20a07　新規糖鎖微粒子を用いたウマインフルエンザウイルスの高感度検出
10:16 ○尾形　慎[1], 山中隆史[2], 相田玲奈[1], 谷地赳拓[1], 山内紀子[1], 大坪忠宗[3], 池田　潔[3], 加藤竜也[4], 朴　龍洙[4], 左　一八[5]（[1]福島高専・化学バイオ, [2]JRA総研, [3]広島国際大・薬, [4]静岡大・グリーン科技研, [5]会津大・短）

2A20a08　糖転移酵素の基質特異性を利用したムチン型糖ペプチドの Chemoenzymatic 合成
10:27 ○吉村弥生[1,2], 高橋佳江[2], 長島　生[3], 清水弘樹[3], 岸本利光[1], 千葉靖典[2]（[1]バイオインダストリー協会㈶, [2]産総研・創薬基盤, [3]産総研・生物プロセス）

2A20a09　L,D-ヘプトース含有オリゴ糖の合成研究
10:38 ○大谷直輝, 一柳　剛（鳥取大農）

2A20a10　Kdo 含有糖鎖で修飾した磁気ナノ粒子の作成と機能評価
10:49 ○一柳　剛, 田中奈央, 薮田行哲（鳥取大農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A20a11　立体特異的 TMS 化反応とそのグリコシド化反応の検討
11:10 ○浅見悠里, 河口優香, 蟹江善美, 蟹江　治（東海大学）

2A20a12　アジドニトロ化における保護基と溶媒の検討
11:21 ○西尾洋祐[1], 萩原智男[1], 西田芳弘[1,2], 土肥博史[1,2]（[1]千葉大院園芸, [2]千葉大・分子キラリティーセンター）

2A20a13　*o*-ホルミルフェニルチオグリコシドによるグリコシル化の反応機構と糖鎖合成への応用
11:32 ○小室晴香[1], 堺　英俊[1], 西田芳弘[1,2], 土肥博史[1,2]（[1]千葉大院園芸, [2]千葉大・分子キラリティー研究センター）

2A20a14　チオエーテル基による 1,2-cis 選択的グリコシル化を用いたオリゴ糖合成
11:43 ○前川丈武, 須田　栞, 西田芳弘, 土肥博史（千葉大院園芸）

A20 会場　午後の部（14:00〜17:37）

生物科学―糖鎖科学 - 糖鎖工学/糖鎖科学 - 構造・機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A20p01　*N*-（L-アラビノフラノシル）ハロアセトアミド両異性体の立体選択的合成
14:00 ○成田　覚[1], 石渡明弘[2], 伊藤幸成[2]（[1]芝浦工大院理工, [2]理研）

2A20p02　結核菌アラビナン分解酵素の機能解析に向けたオリゴアラビノフラノシド誘導体の合成研究
14:11 ○石渡明弘, 伊藤幸成（理研）

2A20p03　連続的マンノシル化反応における立体選択性の検証
14:22 ○佐野加苗, 小杉実沙, 石井希実, 松尾一郎（群馬大院理工）

2A20p04　保護基及び溶媒の効果を利用した立体選択的な *O*-結合型糖鎖の合成
14:33 ○太田雄大[1], 白井　彰[2], 松尾一郎[1,2]（[1]群馬大院・理工, [2]群馬大・理工）

2A20p05　化学修飾糖鎖を用いた ENGase 糖転移反応の追跡
14:44 石井希実, 佐野加苗, ○松尾一郎（群馬大院理工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A20p06　マイクロ波を利用した *N*-アセチルグルコサミン脱水反応の検討
15:05 ○長島　生, 奥山市子, 加我晴生, 清水弘樹（産総研 生物プロセス）

2A20p07　無保護糖供与体のオキサゾリン環開裂を伴う新規グリコシド化反応
15:16 ○濱屋　湧[1], 安藤弘宗[2], 石田秀治[1,2], 田中秀則[3]（[1]岐阜大・応用生物, [2]岐阜大・G-CHAIN, [3]高知大・総合研究セ）

2A20p08　免疫賦活活性を有するグリセロ糖脂質の合成と生物活性
15:27　○栗田一生[1], 八神なほ子[1], 今井崇史[3], 山崎　晶[3], 今村彰宏[1], 安藤弘宗[1,2],　石田秀治[1,2]　([1]岐阜大院・応用生物,　[2]岐阜大・G-CHAIN, [3]大阪大・微生物病研究所)

2A20p09　薬物送達システムへの応用を指向した新規糖鎖デンドロンの開発研究
15:38　○田中友理[1], 前田雄介[1], 今村彰宏[1,2], 石田秀治[1,2], 上野義仁[1,2], 安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物, [2]岐阜大・G-CHAIN)

2A20p10　ハイブリッド型コンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成
15:49　○上村明寿美[1],　松下健也[2],　中田有美[3],　武田－奥田尚子[4], 田村純一[1,2,3,4]　([1]鳥取大院農, [2]鳥取大院工, [3]鳥取大地域環境, [4]鳥取大農)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A20p11　二環性供与体を用いた α-シアリル化の検討
16:10　○河村奈緒子[1], 加藤慶一[2], 今村彰宏[2], 石田秀治[1,2], 安藤弘宗[1] ([1]岐阜大・G-CHAIN, [2]岐阜大・応用生物)

2A20p12　グロボ系ガングリオシドの膜ドメイン形成機構解明を目指した蛍光アナログ分子の開発
16:21　○浅野早知[1], 河村奈緒子[2], 今村彰宏[1], 鈴木健一[2], 石田秀治[1,2], 安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物, [2]岐阜大・G-CHAIN)

2A20p13　野生ニホンジカ未利用部位に含まれるコンドロイチン硫酸の分析
16:32　○田村純一, 武田ー奥田尚子　(鳥取大農)

2A20p14　モサオゴノリから κ-カラギーナン様アガロースの同定
16:43　○田幸正邦[1,2],　蒋　　文[1],　島袋隼平[1],　小西照子[1]　([1]琉球大農生資科, [2]健康長寿科研)

2A20p15　動物由来シアル酸 9-リン酸合成酵素(SPS)の性質の解析
16:54　○石川寛菜[1,2],　佐藤ちひろ[1,2],　北島　健[1,2]　([1]名大・生物機能センター, [2]名大院・生命農学研究科)

p16〜p17 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A20p16　Establishment and characterization of medaka fish deficient in alveolin, a cortical alveolus-specific astacin family protease
17:15　○Bo FU[1,2], Chihiro SATO[1,2], Ken KITAJIMA[1,2]　([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

2A20p17　α2,8-シアル酸転移酵素(ST8SIA)の生合成するエピトープと抗シアル酸抗体の特異性の解析
17:26　○津田佳奈[1,2],　高橋映莉乃[1,2],　北島　健[1,2],　佐藤ちひろ[1,2] ([1]名大・生物機能センター, [2]名大・生命農学)

A21 会場　午前の部(9:00〜11:54)

生物科学—タンパク質・ペプチド科学 - 構造—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A21a01　β-glucosidase をタグとして用いたタンパク質の結晶化手法の開発
9:00　○久家滉太[1],　佐々木大嗣[1],　須恵雅之[2],　佐々木康幸[1], 伊藤晋作[1],　矢嶋俊介[1]　([1]東農大　バイオ, [2]東農大　生物応用化学科)

2A21a02　*Bacillus* sp. OxdB-1 由来アルドキシム脱水酵素の構造解析に向けた結晶スクリーニング
9:11　○森　智也[1], 松井大亮[1,2], 浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工, [2]JST ERATO)

2A21a03　ドリアン由来アルコールアシルトランスフェラーゼの結晶構造解析
9:22　○元島史尋[1,2],　大島遼太郎[1],　石田裕幸[2,3],　森　利明[1], 吉川千晶[1], 浅野泰久[1,2]　([1]富山県大・生工研セ, [2]ERATO, JST, [3]八丈島発光生物研究所)

2A21a04　The crystal structure and catalytic mechanism of recombinant hydroxynitrile lyase from cyanogenic millipede, Oxidus gracilis
9:33　○Siriporn CHAIKAEW[1,2], Fumihiro MOTOJIMA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2]　([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

2A21a05　Expression, purification and crystallization of FsrC, the cell surface receptor of the cyclic peptide quormone GBAP
9:44　○Mimin ZHANG[1], Kou HAYAKAWA[1], Yi LU[1], Yukei KATAYAMA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Michio SUZUKI[1], Kenji SONOMOTO[3], Jiro NAKAYAMA[3], Masaru TANOKURA[1], Koji NAGATA[1]　([1]The univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]Kyushu Univ.)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A21a06　*Microbacterium hydrocarbonoxydans* 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析
10:05　○島村香穂[1],　秋山友了[1],　竹野谷美穂子[1],　伊藤晋作[1], 佐々木康幸[1], 高谷直樹[2], 矢嶋俊介[1]　([1]東農大・生命科・バイオ, [2]筑波大・生命環境)

2A21a07　超好熱アーキア由来 FAD 依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析
10:16　○大志田達也[1], 冨家英嗣[1], 川上竜巳[2], 里村武範[3], 米田一成[4], 大島敏久[5], 櫻庭春彦[1]　([1]香川大農, [2]徳島大生物資源, [3]福井大工, [4]東海大農, [5]大工大工)

2A21a08　多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の構造安定性
10:27　○杉本華幸，本山彩香，片桐絵里奈，渡邉剛志，鈴木一史　(新潟大・農・応生化)

2A21a09　スター活性が低下した変異型 EcoO109I 制限酵素と DNA 複合体の X 線結晶構造解析
10:38　○渡邉幸夫，三上文三，喜多恵子　(京大院農)

2A21a10　各種変異体を用いた人工酵素レトロアルドラーゼ RA61 の構造機能解析
10:49　○岡実智子[1],　稲葉理美[2],　沼本修孝[3],　伊藤暢聡[3], ロイプロディップ[4], 田中富士枝[4], 織田昌幸[1]　([1]京府大・院生環科, [2]高輝度光科学研究センター, [3]医科歯科大・難研, [4]沖縄科学技術大学院大)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A21a11　グリコサミノグリカンの輸送に関わる細菌タンパク質は二種類の基質結合型 closed 構造をとる
11:10　○老木紗予子[1],　佐藤賢宏[2],　蒲地玲子[2],　三上文三[1,2], 村田幸作[3], 橋本　渉[1,2]　([1]京大院・農, [2]京大・農, [3]摂南大・理工)

2A21a12　pH dependency of iron coordination by TtFbpA, a periplasmic iron-binding subunit of ABC-type transporter from Thermus thermophilus HB8, analyzed by solution NMR
11:21　○Peng Lu[1], Kobayashi Yoshiki[1], Mimin Zhang[1], Yi Lu[1], Yukie Katayama[1], Michio Suzuki[1], Etsuro Yoshimura[1,2], Koji Nagata[1]　([1]The University of Tokyo, [2]The Open University of Japan)

2A21a13　麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の液中における単量体・多量体の性質と挙動
11:32　○大沢千晶, 田中拓未, 吉見　啓, 七谷　圭, 阿部敬悦　(東北大院農)

2A21a14　アポリポプロテイン E によるピロール化タンパク質の制御
11:43　○平出直哉[1], 柴田貴広[1], 内田浩二[2]　([1]名大院・生命農, [2]東大院・農学生命)

A21 会場　午後の部（14:00〜17:37）

生物科学―生物工学 - 解析技術・方法論―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A21p01　次世代シーケンスによる逆転写酵素の正確性の解析
14:00　○保川　清[1], 飯田　慶[2], 岡野啓志[1], 秀瀬涼太[3], 馬場美聡[1], 柳原　格[4], 兒島憲二[1], 滝田禎亮[1], 藤原伸介[3]　([1]京大院農, [2]京大院医, [3]関西学院大, [4]大阪母子医療セ)

2A21p02　機械学習とネットワーク解析を使用した腸内細菌叢変動の解析
14:11　○嶋　秀明[1], 益田静香[1], 伊達康博[2,3], 篠阿弥宇[2], 坪井裕理[2], 梶川瑞穂[1], 井上能博[1], 金本大成[1], 菊地　淳[2,3]　([1]昭和薬科, [2]理研, [3]横市大)

2A21p03　CIRSPR/Cas9 を利用した *Geobacter Sulfurreducens* における効率的な複数遺伝子破壊株作製法の確立
14:22　○藤川　昂, 井上謙吾　(宮崎大学)

2A21p04　部位特異的非天然アミノ酸導入を応用した厳密な翻訳調節法
14:33　○加藤祐輔　(農研機構・生物機能)

2A21p05　固相誘導体化法を用いた GC/MS メタボロミクス分析法の開発
14:44　○新川翔也[1], 笹々野僚一[2], 古野正浩[1], 福崎英一郎[1]　([1]阪大院工, [2]アイスティサイエンス)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A21p06　細径モノリスカラムを用いた高感度プロテオミクスとその感度評価
15:05　○大谷優太[1], 藤井温子[1], 油屋駿介[1,2], 水口博義[3], 三浦夏子[1], 青木　航[1], 植田充美[1]　([1]京大院・農・応用生命, [2]日本学術振興会, [3]㈱京都モノテック)

2A21p07　高感度かつ再現性の高い代謝物局在解析を可能とする質量分析イメージングに向けた新たな試料調製法の開発
15:16　○一瀬智美[1], 藤村由紀[1], 山崎雄三[2], 割石博之[1], 三浦大典[1]　([1]九州大学, [2]島津製作所)

2A21p08　緩和時間計測データと機械学習に基づく代謝プロファイリング技術の構築
15:27　○伊達康博[1,2], 魏　菲菲[1], 坪井裕理[1], 清水智子[1], 坂田研二[1], 菊地　淳[1,2,3]　([1]理研CSRS, [2]横市院生命医, [3]名大院生命農)

2A21p09　拡散 NMR と演繹的手法による代謝物群の *in silico* 同定法の高度化
15:38　○伊藤研悟[1,2], 坪井裕理[1], 伊達康博[1,2], 菊地　淳[1,2,3]　([1]理研CSRS, [2]横市院生命医, [3]名大院生命農)

2A21p10　高・低分子混合物の NMR シグナル帰属能向上を目指した InterSpin ツール開発
15:49　○山田隼嗣[1,2], 伊藤研悟[2,3], 黒谷篤之[2], 山田　豊[2], 近山英輔[2,4], 菊地　淳[1,2,3]　([1]名大院生命農, [2]理研環境資源, [3]横市大院生命医, [4]新潟国情大情報文化)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A21p11　マイクロ流路を利用したハイスループット GPCR リガンドアッセイ系の開発
16:10　○柳沼謙志[1], 三浦夏子[1,2], 青木　航[1,2,3], 小川雅人[4], 西川洋平[4], 細川正人[3,5], 竹山春子[4,5], 植田充美[1]　([1]京大院・農・応用生命, [2]JST-CREST, [3]JST-さきがけ, [4]早大院先進理工, [5]早大ナノライフ創研)

2A21p12　信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる新規アルカリホスファターゼ測定法の開発
16:21　○佐々本康平, 西矢芳昭　(摂南大理工)

2A21p13　局所麻酔薬プロカインによるグラミシジン A チャネルを介したイオン透過の阻害機構
16:32　山口拓也, ○白井　理, 北隅優希, 加納健司　(京大院農)

2A21p14　神経軸索を模擬した液膜型セル系を用いた電位固定法についての検討
16:43　○加地麻衣子, 白井　理, 北隅優希, 加納健司　(京大院農)

2A21p15　メタノールセンサー酵母細胞を用いたペクチンメチルエステラーゼ活性の可視化と評価
16:54　○竹谷友之, 由里本博也, 阪井康能　(京大院農)

p16〜p17 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A21p16　ボトムアップジェネティクスの実現に向けた *in vitro* 転写翻訳システムの改良
17:15　○青木　航, 古村　崚, 植田充美　(京大院・農・応用生命)

2A21p17　全自動 1 細胞解析単離装置によるヒト血液からのモノクローナル抗体の迅速樹立
17:26　○小林佑輔[1], 立松健司[1], 山﨑智子[1], 高井みな実[1], 田中勇悦[2], 黒田俊一[1]　([1]阪大・産研, [2]琉大・医)

A22 会場　午前の部（9:00〜11:32）

生物科学―タンパク質・ペプチド科学 - 機能/タンパク質・ペプチド科学 - その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A22a01　活性型および不活性型組換えヒトチロシナーゼの発現
9:00　○太田珠里亜[1],　本澤友里[1],　中村友也[1],　阿波賀希絵[2], 渋川弘貴[1], 横山佳大[2], 奥村裕紀[1,2], 氏田　稔[1,2]　([1]名城大院農, [2]名城大農)

2A22a02　カイコ-バキュロウイルス発現系を用いた活性型組換えヒトチロシナーゼの発現
9:11　○横山佳大[1], 中村友也[2], 本澤友里[2], 太田珠里亜[2], 小池正太[2], 奥村裕紀[1,2], 氏田　稔[1,2]　([1]名城大農, [2]名城大院農)

2A22a03　ヒトフィラグリンとヒトケラチンの相互作用
9:22　○本澤友里[1],　永田理奈[2],　佐々木久実[2],　高橋美緒[2], 長谷川瑛美[2], 奥村裕紀[1,2], 氏田　稔[1,2]　([1]名城大院農, [2]名城大農)

2A22a04　食品タンパク質酵素加水分解物中に含まれるカチオン性抗菌ペプチドの創傷治癒活性とその作用機構
9:33　○谷口正之, 斉藤寿槻, 生江俊樹, 落合秋人, 田中孝明　(新潟大自然研)

2A22a05　黄色ブドウ球菌二成分性毒素 γ-ヘモリジンの β バレル型膜孔形成機構の解明
9:44　○武田慶胤[1], 田中良和[2], 金子　淳[1]　([1]東北大院農, [2]東北大院生命)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A22a06　溶血性レクチン CEL-III のドメイン 3 変異体を用いた多量体化機構の解明
10:05　○郷田秀一郎, 山脇佑太, 海野英昭, 畠山智充　(長崎大工)

2A22a07　D-ferredoxin-1 の化学合成
10:16　○石田優介, 大西裕介, 栗栖源嗣, 北條裕信　(阪大蛋白研)

2A22a08　ヒト SUMO2 変異体ライブラリからの PD-1 結合クローンの選択
10:27　○牧野祥嗣, 河上佳奈, 伊藤伸哉　(富山県大工)

2A22a09　抗菌ペプチド cecropin P1（CP1）の calmodulin を用いた *E. coli* を宿主とした大量発現
10:38　○加藤貴純[1],　石田博昭[2],　大沼幸暉[1],　塚本　卓[1,3,4], 菊川峰志[1,3,4],　出村　誠[1,3,4],　ホーゲルハンス[2],　相沢智康[1,3,4]　([1]北大理, [2]カルガリー大, [3]北大先端生命, [4]北大GI-CoREソフトマターGS)

2A22a10　緑膿菌 OprM LOOP2 に対する抗体可変領域の大腸菌における発現検討
10:49　○矢野遥香,　大須賀悠希,　良原栄策,　小島直也,　笹川　昇　(東海大学)

a11〜a12 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A22a11　Protein A 担体を用いたマウスモノクローナル抗体の精製における溶出条件の検討
11:10　○豊田精宏，中田文弥，小林　昭　（東ソー㈱）

2A22a12　海産無脊椎動物グミ由来新規レクチンの分離精製とその特徴付け
11:21　○矢崎裕太，栗原拓海，米倉政美，上妻由章　（茨大農）

A22 会場　午後の部（14:00〜16:54）

動物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A22p01　口腔外における苦味受容体 Tas2r の発現とその機能解析
14:00　○大泉由佳[1]，八巻美智子[2]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]　([1]東北大・院農，[2]東北生活文化大家政)

2A22p02　セリン欠乏による Imsulin/IGF シグナル伝達減弱の分子機序
14:11　○河野　唯[1]，阿比留舞子[1]，濱野桃子[1,2]，佐矢野智子[3]，古屋茂樹[1,4]　([1]九大農，[2]福岡女子大学，[3]理化学研究所BSI，[4]九州大学イノベーティブバイオアーキテクチャーセンター)

2A22p03　マクロファージはオートファジーを介して炎症反応を制御する
14:22　○米野雅大, 白木琢磨, 芦田　久　（近畿大・院・生物理工）

2A22p04　卵由来スフィンゴミエリンによる肝癌細胞死誘導およびその機構解析
14:33　○山田可奈子，山田佳奈，髙宮奈津子，三浦　豊　（東京農工大学）

2A22p05　癌細胞と正常細胞の相互作用による MMP-2 産生誘導機構の解析
14:44　○島崎なつみ，酒井史彦，三浦　豊　（東農工大農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A22p06　間葉系幹細胞の細胞外基質の硬さに対する応答における SORBS ファミリータンパク質の役割
15:05　○黒田美都[1,3]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1,2]　([1]京大院農，[2]京大iCeMS，[3]学振研究員DC[1])

2A22p07　普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 の哺乳動物における機能解析
15:16　○小川哲弘[1]，岩本京夏[1]，隅倉敦美[1]，内田萌菜[2]，藤井　渉[3]，チェンバーズジェームズ[2]，米澤智洋[2]，日高真誠[1]，角田　茂[2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大院・農生科・獣医，[3]東大院・農生科・応動)

2A22p08　高濃度のグルコース存在下におけるフルクトースの脂肪組織由来幹細胞の脂肪分化に与える影響
15:27　○山口貴史，今西陽亮，江藤　望，服部秀美　（宮崎大農）

2A22p09　運動・温熱・栄養条件の変化に応答した新規マイオカイン CXCL10 の発現制御
15:38　○石内友里，園田彩乃，辻村和希，小松愛海，能勢千晶，根建　拓　（東洋大生命）

2A22p10　ルーメン内繊維分解細菌間相互作用の NMR メタボローム解析を用いた研究
15:49　○稲村勇雅[1]，山野めぐみ[1]，北田直也[1]，久米田博之[2,3]，熊木康裕[2]，大西裕季[2]，塚本　卓[1,2,3]，菊川峰志[1,2,3]，出村　誠[4]，福間直希[4]，村住侑毅[4]，小池　聡[4]，小林康男[4]，相沢智康[1,2,3]　([1]北大院生命科学院，[2]北大院先端生命，[3]北大GI-Coreソフトマター GS，[4]北大院農学研究院)

p11〜p14 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A22p11　線虫のカルシニューリンが関わる寿命制御機構の解析
16:10　○河田小茄実[1]，近藤春佳[2]，久米一規[2]，Blackwell Keith[3]，水沼正樹[2]　([1]広島大・工，[2]広島大院・先端研，[3]ハーバード大学)

2A22p12　エンドウヒゲナガアブラムシ（*Acyrthosiphon pisum*）の自然免疫系における Toll 受容体と Spaetzle リガンドの機能解析
16:21　○竹下勇斗[1]，河部陽平[1]，丸山航平[1]，和田崇史[2]，志和　睦[2]，河野　強[1]，岩崎　崇[1]　([1]鳥取大院農，[2]鳥取大農)

2A22p13　培養始原生殖細胞株の樹立と CRISPR/Cas9 による eGFP ノックインニワトリの作製
16:32　○萩原遥太, 奥嵜雄也, 金岡英徳, 飯島信司, 西島謙一　（名古屋大工）

2A22p14　ニワトリにおけるカルシウム感知受容体 CaSR を介したコク味物質の受容
16:43　○川端二功，大森　光，川端由子，西村正太郎，田畑正志　（九大院農）

A23 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A23a01　抗肥満ホルモン FGF21 の新規発現制御因子の同定
9:00　○清水　誠[1]，梅村真理子[2]，高橋勇二[2]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]　([1]東大農，[2]東薬大生命)

2A23a02　寒冷刺激に応答する新規転写因子の同定
9:11　○不野歩美[1]，清水　誠[1]，毛受佑斗[1]，梅村真理子[2]，高橋勇二[2]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]　([1]東京大農，[2]東薬大生命)

2A23a03　MIG12 による ACC 活性化機構の解析
9:22　○平口遥香，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎　（東大院農生科 応生化）

2A23a04　コール酸は体熱産生には影響を及ぼさずにマウスの体重増加を抑制する
9:33　○岡本　篤，増澤（尾﨑）依，細野　崇，関泰一郎　（日大院・生資科・応生科）

2A23a05　コール酸負荷によるラット回腸組織でのアディポネクチン集積
9:44　○橘田真理[1]，加茂佳恵[2]，趙　佳賢[2]，原　博[2]，石塚　敏[2]　([1]北大農，[2]北大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A23a06　明暗シフトが生体機能に及ぼす影響
10:05　○山本幸佳[1]，沼田　実[1]，保田倫子[2]，三浦信彦[3]，高橋統一[1]，平野明伽音[1]，下位香代子[1]　([1]静岡県大食，[2]椙山女学園大，[3]労働安全衛生総合研究所)

2A23a07　摂食時間制限による肥満予防メカニズムの解明
10:16　○小島貴之, 守川直樹, 渡邉　諒, 増澤（尾﨑）依, 細野　崇, 榛葉繁紀, 関泰一郎　（日本大学）

2A23a08　TRPA1 アゴニストであるシンナムアルデヒド胃内投与による体温変化の作用機序の解析
10:27　○森　紀之，浦田朋実，福渡　努　（滋賀県大人間文化）

2A23a09　*Sod1* ノックアウトマウスにおける腸内細菌叢と代謝産物の変化
10:38　○鷺　陽香[1]，戸田年彦[2]，小澤裕介[2]，中西裕美子[3]，大野博司[3]，宮本浩邦[3,4]，児玉浩明[4]，清水孝彦[2]　([1]千葉大・園芸，[2]千葉大院・医，[3]理研・IMS，[4]千葉大院・園芸)

2A23a10　蛍光胆汁酸を利用した新規膵管可視化法の開発
10:49　○中嶋ちえみ[1]，神元健児[2]，美谷島克宏[3]，山根拓実[3]，大石祐一[3]，岩槻　健[3]　([1]東農大院農，[2]ワシントン大医，[3]東農大応生)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A23a11　アミノ酸が肝臓のインスリン様成長因子-I 遺伝子発現に及ぼす影響の解析
11:10　○長田悠加[1]，山中大介[1]，西　宏起[1]，合田祐貴[1]，熊野未佳子[1]，豊島由香[2]，竹中麻子[3]，片岡直行[1]，伯野史彦[1]，高橋伸一郎[1]　([1]東大院農生科，[2]日医大先端医学研究所，[3]明大農)

2A23a12　肝臓の脂質代謝における Iah1 遺伝子の作用：肝臓特異的 Iah1 欠損マウスを用いて
11:21　○金森深作[1]，小林美里[1]，鈴木　京[1]，舛屋智美[1]，大野民生[2]，村井篤嗣[1]，堀尾文彦[1]　([1]名大生命農，[2]名大医学)

2A23a13　Nrf1 欠失マウス肝において非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を誘導する代謝経路の探索
11:32　○谷内めぐみ，井口瑶子，辻田忠志　(佐賀大農)

2A23a14　エストロジェンは肝臓コリン代謝を調節する
11:43　○秋山　慧[1]，宮地佑希野[2]，齊藤亜佑美[1]，KUMRUNGSEE Thanutchaporn[2]，矢中規之[2]　([1]広島大生物生産学部，[2]広島大院生物圏)

2A23a15　唾液腺と唾液の性差形成に及ぼすアンドロゲンシグナリングの影響
11:54　○原田直樹[1]，竹中重雄[2]，乾　博[2]，山地亮一[1]　([1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大・栄養)

A23 会場　午後の部(14:00〜17:59)

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A23p01　プロスタグランジン D_2 に由来する脂質メディエーターの解析
14:00　○犬塚恵美[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[2]　([1]名大院・生命農，[2]東大院・農生科)

2A23p02　アスコルビン酸欠乏による肝臓と腸管での炎症関連因子の発現誘導
14:11　○川出野絵，鈴木若奈，大谷祥也，村井篤嗣，小林美里，堀尾文彦　(名古屋大農)

2A23p03　Class A CpG オリゴ DNA による播種性血管内凝固症候群の改善効果
14:22　○山本祥也[1,2]，荻田　佑[3]，下里剛士[4]　([1]信州大院・総合工，[2]学振(DC[2])，[3]信州大・バイオメディカル研，[4]信州大・菌類微生物セ)

2A23p04　四塩化炭素誘導肝障害からの再生過程におけるマクロファージの除去は肝代謝機能の回復を遅延させる
14:33　○三浦　徳[1]，鎌倉美和子[2]，御子柴直樹[2]，増澤(尾﨑)依[1,2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化)

2A23p05　β-クリプトキサンチンによる骨格筋萎縮抑制作用について
14:44　○野中麻由[1]，北風智也[2]，向井克之[3]，原田直樹[1]，乾　博[4]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]㈱ダイセル，[4]大阪府大院・栄養)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A23p06　胆汁酸受容体 TGR5 は骨格筋を肥大化し筋力の増大を誘導する
15:05　○佐々木崇，久保山文音，村田翔太朗，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

2A23p07　ATF6α および Ca^{2+} シグナルによる Tmem100 発現制御機構
15:16　○久保山文音，佐々木崇，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

2A23p08　骨格筋萎縮時に発現誘導される Ankrd1 の機能解析
15:27　○吉田壮志[1]，橋詰　力[2]，清水　誠[1]，井上　順[1]，山内祥生[1]，佐藤隆一郎[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]静県大・栄養生命科)

2A23p09　筋萎縮時に DNA メチル化酵素 Dnmt3a の低下は筋再生を抑制する
15:38　○畑澤幸乃[1]，小野悠介[2]，広瀬優真[1]，岡野正樹[3]，小川佳宏[4]，亀井康富[1]　([1]京都府立大生命環境，[2]長崎大医歯薬，[3]熊本大発生医研，[4]東京医歯大医歯)

2A23p10　GDE5 骨格筋過剰発現マウスはストレス誘導性の sarcopenia 自然発症モデルとして有用である
15:49　○佐藤洸司[1]，橋本貴生[2]，梶原　香[2]，楊　波[2]，岡崎優利[2]，和田正信[3]，THANUTCHAPORN Kumrungsee[2]，矢中規之[2]　([1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏，[3]広島大総合科学)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A23p11　*C.elegans* を用いた生活習慣病胎児期起源説のエピジェネティック解析
16:10　○磯部芙久子，坂上美登理，西田彩乃，岡田嵯和子，下地頭所理美，齋藤春佳，清水　愛，森下真有，山本佳苗，宮前さつき，松本晋也　(京女大家政)

2A23p12　繰り返し絶食を経験した C. elegans のおける脂肪蓄積量の増加
16:21　○松本晋也，澤永朱里，山本さゆり，佐藤奈生，長尾美咲，山本佳苗，山本玲奈，岡部祐実　(京女大食物)

2A23p13　安定化 DHA・EPA 油摂取による β アミロイド脳室内単回投与マウスの学習障害改善作用
16:32　○市瀬嵩志[1]，加藤真晴[2]，入江智子[1]，村澤寛泰[3]，橘　伸彦[1]([1]不二製油グループ本社株式会社　未来創造研究所，[2]不二製油株式会社　油脂開発室，[3]株式会社日本バイオリサーチセンター)

2A23p14　中枢性疲労を軽減する食品成分の探索
16:43　○志村広樹，井上和生　(京大院農)

2A23p15　SIRT1 はショ糖摂食選択行動を制御する
16:54　○松居　翔，佐々木努，河野大輔，橋本博美，小林雅樹，北村忠弘　(群馬大生調研)

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A23p16　アルツハイマー治療薬メマンチンによる社会的敗北ストレス後の PTSD 症状の改善
17:15　○内田千晶，石川理絵，喜田　聡　(東農大院)

2A23p17　前頭前野を中心とした社会行動と社会的認知記憶を制御する神経ネットワークの同定
17:26　○櫻内華恵, 谷水俊之, 石川理絵, 喜田　聡　(東京農大院・農・バイオ)

2A23p18　不快臭に対する嗅覚行動に及ぼすオキシトシン受容体の役割
17:37　○長田和実[1]，宮園貞治[2]，西森克彦[3]，柏柳　誠[2]　([1]北医療大歯，[2]旭川医大医，[3]東北大農)

2A23p19　加齢に伴う味覚感受性の変化
17:48　○藤記沙耶華[1]，冷水里穂子[1]，青山朋樹[2]，林由佳子[1]　([1]京都大学院農学研究科，[2]京都大学院医学研究科)

A24 会場　午前の部(9:00〜11:43)

動物―細胞工学 - 物質生産，タン パク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A24a01　ハイスループット解析に適したヒト嗅覚受容体発現細胞の樹立
9:00　○中村実世，立松健司，山﨑智子，高井みな実，黒田俊一(大阪大　産業科学研究所)

2A24a02　ブタマクロファージ不死化細胞株の樹立と特性解析
9:11　○竹之内敬人[1]，木谷　裕[1]，鈴木俊一[1]，中井美智子[1]，淵本大一郎[1]，月本光俊[2]，新開浩樹[1]，佐藤　充[1]，上西博英[1]　([1]農研機構・動物機能利用，[2]東理大・薬)

2A24a03　生体内硫化水素イオンによるメチル化タンパク質は選択的オートファジーを誘発する.
9:22　○井上博文，林　幸奈，大口真穂，勝間田(坪井)理恵，高橋信之，上原万里子　(東京農大・応生・健康)

2A24a04　コレステロール代謝とポリアミン代謝の結節点としての癌細胞の足場非依存的増殖機構
9:33　○田中亜路，柿本未来，岡本翔子　(安田女子大薬)

2A24a05　遺伝子導入ニワトリによる TGF-β1 の卵白生産
9:44　○上平正道, 大坪嵩征, 小畑玲奈, 河邉佳典, 井藤　彰　（九大工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A24a06　フタホシコオロギにおける Neuropeptide F による摂食行動の制御機構の解明
10:05　○清家　瞳,　福村圭介,　永田晋治　（東大院・新領域・先端生命科学）

2A24a07　Effects of adipokinetic hormone and its related peptide on maintaining hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
10:16　○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA　（Univ. of Tokyo）

2A24a08　カイコ *Bombyx mori* における DHCR24 のホモログタンパク質の酵素活性測定
10:27　○藤盛春奈, 永田晋治　（東大院・新領域・先端生命科学）

2A24a09　ミズクラゲに対するストロビレーション阻害物質の活性の解析
10:38　○藤井夏鈴[1], 黒田理絵[1], 辻田菜摘[1], 小山寛喜[1], 荒川賢治[2], 国吉久人[1]　（[1]広島大院・生物圏, [2]広島大院・先端研）

2A24a10　ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現変動する新規分泌タンパク質遺伝子ファミリーの解析
10:49　○辻田菜摘[1,4], 辻　敏之[2], 渡部彰大[1], 小山寛喜[1], 荒川賢治[3], 国吉久人[1]　（[1]広島大院・生物圏,　[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス,　[3]広島大院・先端研,　[4]広島大・グローバルキャリアデザインセンター）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A24a11　クロマグロ稚魚における飼料入力・糞便出力の代謝反応場追跡手法の開発
11:10　○坂田研二[1],　朝倉大河[1],　相馬智史[2],　馬久地みゆき[2], 伊達康博[1], 横山佐一郎[3], 菊地　淳[1,4,5]　（[1]理化学研究所, [2]水産研究・教育機構, [3]鹿児島大学・水産, [4]横市院・生命医, [5]名大院・生命農）

2A24a12　ウナギ幼生の飼料候補探索における重要因子選択法の開発
11:21　○朝倉大河[1], 種田あずさ[1], 稲葉信晴[2], 長井　敏[2], 黒木洋明[2], 長谷川大介[2], 菊地　淳[1,3,4]　（[1]理研 CSRS, [2]水産研究・教育機構, [3]横市院 生命医, [4]名大院・生命農）

2A24a13　魚類多様性の表現型と代謝物・共生微生物データ間のアソシエーション特性解析
11:32　○佐藤有穂[1,2],　朝倉大河[1],　坂田研二[1],　伊達康博[1,2], 菊地　淳[1,2,3]　（[1]理研 CSRS, [2]横市院生命医, [3]名大院生命農）

A24 会場　午後の部（14:00〜17:48）

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A24p01　哺乳類の染色体構造変化を単一細胞で網羅的に解析する
14:00　○竹林慎一郎　（三重大医）

2A24p02　DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷機構：DNA メチル化酵素 KO 細胞へのヘミメチル化 DNA の導入
14:11　○奥村克純[1], 服部　楓[1], 柴田隆豊[1], 緒方　進[1], 緒方正人[2], 竹林慎一郎[2]　（[1]三重大院生資, [2]三重大院医）

2A24p03　細胞核構造維持と遺伝子発現制御における核内 F-アクチンの機能解析
14:22　○高橋祐人[1],　山本浩志[2],　山崎祥他[3],　原田昌彦[1,2]　（[1]東北大農, [2]東北大院農, [3]理化学研究所）

2A24p04　G-アクチン結合性二重環状ペプチドを用いた細胞核内アクチンの機能解析
14:33　○平塚晶吾[1], 町田奈々子[2], 秋山祐亮[2], Christian Heinis[3], Bertoldo Davide[3], 原田昌彦[1,2]　（[1]東北大・農, [2]東北大学院・農, [3]EPFL・LPPT）

2A24p05　リジン長鎖アシル化修飾による転写因子 TEAD の活性制御機構の解析
14:44　○則次恒太[1,2],　伊藤昭博[2,3],　小川健司[4,5],　鈴木健裕[6], 堂前　直[6], 吉田　稔[1,3,4,5]　（[1]東大院・農生科・応生工, [2]東薬大・生命科学, [3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス, [4]理研・化学遺伝, [5]理研・環境資源・創薬シード, [6]理研・環境資源・生命分子解析）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A24p06　マウス胚性腫瘍細胞の神経分化過程における Prdm 遺伝子の機能解析
15:05　○馬場　映[1],　土井信太郎[1],　須和田拓耶[2],　久原　哲[1], 田代康介[1]　（[1]九州大 院生資環　遺伝子制御,　[2]九州大 農　応生遺伝子制御）

2A24p07　脳卒中発症ラット SHRSP において発育低下がみられる骨格筋の遺伝子発現解析
15:16　○井上敬夫[1], 萩山　満[1], 水口信行[2], 木村竜一朗[1], 前西　修[1], 筑後孝章[1], 木村雅友[1], 伊藤龍生[3], 佐藤隆夫[4], 伊藤彰彦[1]　（[1]近大・医・病理, [2]近大・ライフサイエンス研, [3]近大・農・食品栄養, [4]近大附属病院・病理診断科）

2A24p08　グルココルチコイドによる筋萎縮関連遺伝子の発現誘導をビタミン D が抑制する
15:27　○広瀬優真,　大西拓己,　畑澤幸乃,　亀井康富　（京府大生命環境科学）

2A24p09　nxt2 は外部環境の違いによりその転写様式を調節する
15:38　○北谷優弥[1], 猪瀬春子[1,2], 西野勝俊[1], 神戸大朋[1], 永尾雅哉[1], 増田誠司[1]　（[1]京都大学生命科学研究科, [2]京都大学農学研究科）

2A24p10　RNA ヘリカーゼ URH49 の新規相互作用因子の同定および機能解析
15:49　○原田光太郎, 藤田賢一, 西野勝俊, 神戸大朋, 永尾雅哉, 増田誠司　（京大院　生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A24p11　ドーパミン D1/D5 受容体と cAMP 情報伝達経路による海馬依存性記憶想起のサーカディアン制御
16:10　○六川智博,　長谷川俊介,　喜田　聡　（東京農大院・農・バイオ）

2A24p12　ビタミン B1 欠乏誘導性記憶障害の分子機構-海馬における転写因子 CREB 情報伝達不活性化と CREB 活性化による記憶障害の改善
16:21　○辻　竜平, 渡辺玉絵, 岸本拓也, 喜田　聡　（東京農大院・農・バイオ）

2A24p13　海馬 TNFα による恐怖記憶の想起制御
16:32　○高橋翔平,　福島穂高,　喜田　聡　（東京農大院・農・バイオ）

2A24p14　カルパイン 10（*CAPN10*）cDNA 配列における re-splicing 現象の解析
16:43　○小野弥子[1],　進藤真由美[2],　土井奈穂子[1],　反町洋之[1]　（[1]公益財団法人東京都医学総合研究所　カルパインプロジェクト, [2]公益財団法人東京都医学総合研究所　基盤技術研究センター）

2A24p15　Ucp1 発現を制御する non-coding RNA の探索と機能解析
16:54　○岩瀬麻里[1], 酒井章子[1], 瀬尾茂人[2], Tony Kuo[3], 高橋春弥[1], 野村　亘[1,4],　Jheng Huie-Fun[1],　荒　武[1],　Paul Horton[3], 大里直樹[2], 松田秀雄[2], 河田照雄[1,4], 後藤　剛[1,4]　（[1]京大院農・食品生物,　[2]阪大院情報・バイオ情報工学,　[3]産総研・人工知能研究センター,　[4]京大・生理化学研究ユニット）

p16〜p18 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A24p16　光遺伝学的手法を用いた海馬による社会行動と社会的認知記憶制御機構の解析
17:15　○清田啓輔, 谷水俊之, 長霞大海, 喜田　聡　（東京農大院・農・バイオ）

2A24p17　海産養殖魚における TILLING 法を用いた新品種の作出技術
17:26　○黒柳美和[1]，成田篤史[2]，岸本謙太[3]，片山貴士[1]，二川伸彦[2]，木下政人[3]，吉浦康寿[1]　([1]水産機構瀬水研，[2]マリンテック，[3]京大院農)

2A24p18　ワモンゴキブリに RNA 干渉を誘導するための dsRNA の導入方法の検討
17:37　○宮田恵多[1]，小澤壮太[2]，長谷川浩一[2]　([1]中部大学生命健康科学部生命医科学科，[2]中部大学応用生物学部環境生物科学科)

A25 会場　午前の部(9:00〜11:21)

酵素―脂質代謝関連酵素/核酸代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A25a01　水酸化脂肪酸を構成脂肪酸として含有するトリアシルグリセロールの合成
9:00　岸野重信[1]，外山大地[1]，○嶋田　渉[1]，米島靖記[2]，小川　順[1]　([1]京大院農，[2]日東薬品工業株式会社)

2A25a02　水酸化脂肪酸をアシル基として有するトリアシルグリセロールの脱酸方法の検討
9:11　○外山大地[1]，岸野重信[1]，米島靖記[2]，小川　順[1]　([1]京大院農，[2]日東薬品工業株式会社)

2A25a03　好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の基質特異性の解析
9:22　○小川拓哉，SUWANAWAT Nittikarn，豊竹洋佑，渡辺文太，川本　純，栗原達夫　(京大化研)

2A25a04　Pin1 阻害作用のある褐藻類ポリフェノールは PPARγ レベルを低下させることでマウスの肥満を抑制した
9:33　○岡田拓実，鈴木充子，生地紘子，内田隆史　(東北大農)

2A25a05　ヒスタミン分泌におけるジアシルグリセロールキナーゼγの機能解析及びその機能性食品への応用
9:44　○倉橋弘平[1]，菊永佐紀子[1]，高岡幸二[2]，上田修司[1]，山之上稔[1]，白井康仁[1]　([1]神戸大農，[2]DSR)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A25a06　海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類からの新規リパーゼの探索
10:05　○石橋洋平[1]，青木敬祐[1]，林　雅弘[2]，沖野　望[1]，伊東　信[1]　([1]九大院農，[2]宮大)

2A25a07　リン脂質の改変を目指した *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株由来新規ホスホリパーゼ A_1 の性質決定
10:16　○田中秀典[1]，齋藤　遼[1]，古谷洋人[1]，辻本善之[1]，鶴岡直樹[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]　([1]京府大院生命環境，[2]産総研)

2A25a08　コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性改変と基質認識機構の考察
10:27　○小山貴之[1]，成田悠理[1]，酒瀬川信一[2]，村山和隆[3]，杉森大助[1]　([1]福島大，[2]旭化成ファーマ，[3]東北大院医工)

2A25a09　Engineered phospholipase D with high specificity for lysophospholipids and diacylphospholipids with short-chain *sn-2* groups
10:38　○Jasmina DAMNJANOVIC，Hideo NAKANO，Yugo IWASAKI　(Nagoya University)

2A25a10　天然ゴム生合成機構におけるゴム粒子の重要性
10:49　石井智樹[1]，末永美樹[1]，山下　哲[2]，山家史大[1]，和氣駿之[1]，小島幸治[1]，山口晴彦[3]，井之上ゆき乃[3]，伏原和久[3]，中山　亨[1]，○高橋征司[1]　([1]東北大院工，[2]金沢大理工，[3]住友ゴム工業)

a11 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A25a11　部位特異的変異導入によるヒト RNase H2 の基質特異性の改変
11:10　○兒島憲二[1,2]，馬場美聡[1]，西村拓人[2]，杉浦拓也[2]，滝田禎亮[1,2]，上原　了[3]，Crouch Robert[3]，保川　清[1,2]　([1]京大院農，[2]京大農，[3]米国国立衛生研)

A25 会場　午後の部(14:00〜17:37)

酵素―酸化還元酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A25p01　リンゴ酸デヒドロゲナーゼの不安定化による比活性の向上
14:00　○下澤勇弥，西矢芳昭　(摂南大学)

2A25p02　Aquificae-type のヒドロゲナーゼの機能解析
14:11　○河野　岳，亀谷将史，新井博之，石井正治　(東大院・農生科)

2A25p03　ヘモグロビンの新規フラボノイド変換活性の発見
14:22　○永久保利紀，熊野匠人，橋本義輝，小林達彦　(筑波大院 生命環境)

2A25p04　Molecular insights into the genesis and evolution of aromatic hydrocarbon catabolic pathway in Thermus oshimai JL-2
14:33　○Joydeep CHAKRABORTY，Mickael GEGOUT，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI，Kazunori OKADA，Hideaki NOJIRI　(The Univ. of Tokyo)

2A25p05　シアノバクテリアのビオチン生合成における新規なタイプの脱水素酵素の発見と機能解析
14:44　○榊　　渓[1]，大石恵太[1]，清水　哲[1]，小林一幾[2]，富田武郎[1]，田中　寛[2]，葛山智久[1]，西山　真[1]　([1]東大・生物工学セ，[2]東工大・資源化学研究所)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A25p06　*Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性の向上
15:05　○林　優花[1]，中村誠彌[1]，酒瀬川信一[2]，中野祥吾[3]，伊藤創平[3]，浅野泰久[4]，杉森大助[1]　([1]福島大・理工，[2]旭化成ファーマ，[3]静岡県大・食品栄養科学，[4]富山県大・生工研セ)

2A25p07　サルコシンオキシダーゼの環状基質反応性の改変
15:16　○黒部督恵，岡島　奨，吉田知左，西矢芳昭　(摂南大理工)

2A25p08　基質特異性改変型乳酸オキシダーゼの作成と新規マンデル酸測定法への応用
15:27　○西矢芳昭，比留田美咲　(摂南大生命科学)

2A25p09　*Pyrobaculum aerophilum* 由来変異型マルチ銅オキシダーゼの酵素化学的性質の解析
15:38　○平野達成[1]，稲垣康平[1]，里村武範[1,2]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]　([1]福井大院，[2]福井大ライフ，[3]香川大，[4]大阪工大)

2A25p10　ゴマリグナン新規酸化酵素の同定
15:49　○村田　純[1]，小埜栄一郎[2]，鎧塚清吾[3]，豊永宏美[2]，白石　慧[1]，森　祥子[1]，寺　正行[1]，東　鋭明[1]，永野　惇[4,5]，中安　大[6]，水谷正治[6]，若杉達也[3]，山本将之[3]，堀川　学[1]　([1](公財)サントリー生命科学財団，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター㈱，[3]富山大院理工，[4]龍谷大農，[5]JST CREST，[6]神戸大農)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A25p11　バイオ電池への応用を目指した好熱菌酵素を用いたバイオアノードの構築
16:10　○里村武範[1,2]，田中志乃[1]，坂元博昭[1,2]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]　([1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]香川大農，[4]大阪工大工)

2A25p12　酸化還元酵素担持用多孔質炭素
16:21　○辻村清也　(筑波大)

2A25p13　Electron transfer from ferredoxin and $\alpha3\beta3$-type oxygenase component of Rieske non-heme iron oxygenase
16:32　○Pi-Cheng TSAI，Joydeep CHAKRABORTY，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI，Kazunori OKADA，Hideaki NOJIRI　(Tokyo Univ.)

2A25p14 ***Bacillus* sp. NTP-1 株における新規テルル酸還元酵素の同定とその機能解析**
16:43 ○葛野侑香[1], 生田帆河[1], 西田　亮[1], 戸部隆太[1], 広瀬　侑[2], Prakash Tejo[3], 三原久明[1]（[1]立命館大, [2]豊橋技科大, [3]Thapar Univ.）

2A25p15 ***Geobacter sulfurreducens* 由来の新奇マルチヘム含有セレンタンパク質の解析**
16:54 ○戸部隆太, 神農美希, 伊豆由紀子, 嶌本奈々, 三原久明（立命大生命）

p16〜p17 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A25p16 **ペプチド・チオエーテル架橋形成酵素 QhpD による環状ペプチド形成機構の解明：基質配列長および配列許容性の解析**
17:15 ○小酒井一輝[1], 大関俊範[1], 中井忠志[2], 谷澤克行[1], 岡島俊英[1]（[1]阪大・産研, [2]広島工大・生命）

2A25p17 **キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の翻訳後修飾における修飾酵素複合体の機能解明**
17:26 ○大関俊範[1], 小酒井一輝[1], 中井忠志[2], 谷澤克行[1], 岡島俊英[1]（[1]阪大　産業科学研究所, [2]広島工大　生命）

A26 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素―糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A26a01 ***Formosa haliotis* MA1 株由来 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid 還元酵素の同定**
9:00 ○濱地野乃香[1], 田中礼士[2], モリテツシ[3], 柴田敏行[2], 三宅英雄[2]（[1]三重大生資, [2]三重大院生資, [3]東農工大工）

2A26a02 **HAD スーパーファミリーに属するハロ酸脱ハロゲン化酵素のハロ酸分解活性の比較**
9:11 ○中村　卓, 李　貢順, 阿部正典, 佐野裕紀, 西川　穂（長浜バイオ大学）

2A26a03 ***Ruminiclostridium josui* のアラビナン分解酵素 Abn43A に存在する 3 つの GH43 モジュールの機能**
9:22 ○北村太一, 粟冠真紀子, 山田和伸, 國武絵美, 木村哲哉, 粟冠和郎（三重大院生資）

2A26a04 ***Ruminiclostridium josui* のアラビナン分解酵素 Abn43A に存在する Laminin_G_3 モジュールの CBM としての働き**
9:33 ○粟冠真紀子, 國武絵美, 木村哲哉, 粟冠和郎（三重大院生資・生命）

2A26a05 ***Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A の CBM6 の吸着特性および不溶性小麦アラビノキシランに対する触媒作用における重要性**
9:44 ○間宮　愛, 田中晶善, 國武絵美, 粟冠真紀子, 木村哲哉, 粟冠和郎（三重大院生資）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A26a06 **糖転移作用を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索**
10:05 ○天井裕可里, 倉掛昌裕（福山大生命）

2A26a07 ***Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規 Polyol oxidase を利用する各種希少糖の生産**
10:16 ○黒石川嵩幸[1], 福井博一[1], 渡邉　彰[1], 吉原明秀[1,2], 何森　健[1,2], 麻田恭彦[1]（[1]香川大農, [2]国際希少糖研究教育）

2A26a08 ***Stenotrophomonas maltophilia* NYT501 由来 *β*-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素化学的性質**
10:27 ○宮　弘昂[1], 平野貴子[1,2], 平川礼人[2], 袴田　航[1,2], 西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科, [2]日大生資科・生命化）

2A26a09 **海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素：異種発現と諸性質検討**
10:38 ○荒井良仁[1], 長尾達彦[2,3], 小松史佳[2], 八木寿梓[4], 鈴木宏和[2], 大城　隆[2]（[1]鳥取大院持社創科, [2]鳥取大院工, [3]日本ジッコウ㈱, [4]鳥取大GSC）

2A26a10 **フコイダン分解細菌 *Luteolibacter algae* H18 のフコシダーゼについて**
10:49 ○長尾達彦[1,2], 山岡美花[1], 荒井良仁[1], 八木寿梓[3], 鈴木宏和[1], 大城　隆[1]（[1]鳥取大院・工, [2]日本ジッコウ株式会社, [3]鳥取大・工・GSC）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A26a11 ***α*-galactosidase に想定される新奇な基質認識機構**
11:10 ○菊池麻子, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫（北大院農）

2A26a12 **ヒト・ドリコールピロリン酸ホスファターゼ hDPP の物理的相互作用の解析**
11:21 ○高橋哲夫, 傅能康成, 山本達也, 北田翔太（東海大工）

2A26a13 **GH130_2 マンノシドホスホリラーゼの単糖受容体特異性とアミノ酸残基の関係による分類**
11:32 ○播磨晃帆, 佐分利亘, 森　春英（北大院農）

2A26a14 ***Melioribacter roseus* 由来セロビオース 2-エピメラーゼは単糖基質にも有意な活性を示す**
11:43 ○佐藤鈴佳[1], 佐分利亘[1], 飯塚貴久[2], 森　春英[1]（[1]北大院農, [2]日本食品化工㈱）

2A26a15 ***Thermoanaerobacter siderophilus* 由来 TsGH15A の各種基質に対する糖転移反応の解析**
11:54 ○竹田夏美, 三島英莉, 佐分利亘, 貞廣樹里, 木村淳夫, 森　春英（北大院農）

A26 会場　午後の部（14:00〜17:59）

酵素―糖質代謝関連酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A26p01 **酵素活性測定に有用な *β*-1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立**
14:00 ○小林海渡[1], 中島将博[1], 中井博之[2], 田口速男[1]（[1]東理大理工, [2]新潟大農）

2A26p02 **イネ由来 *β*-グルコシダーゼ BGlu1 の糖転移反応の速度論的解析**
14:11 ○堀越　秀, 佐分利亘, 松浦英幸, 森　春英（北大院農）

2A26p03 **デキストラン デキストリナーゼの多糖合成に関与するアミノ酸の同定**
14:22 ○佐々木優希, 熊谷祐也, 貞廣樹里, ラングヴィーラヌッチ, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫（北大院農）

2A26p04 ***Flavobacterium johnsoniae* 由来 GH26 マンナン 1,4-マンノビオシダーゼおよび GH97*α*-ガラクトシダーゼの機能解析**
14:33 ○佐分利亘, 森　春英（北大院農）

2A26p05 ***Halobacillus halophilus* 由来 *β*-1,6-グルコシダーゼの機能解析**
14:44 ○寺田真衣, 磯野直人（三重大院生物資源）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A26p06 ***Aspergillus kawachii* 由来 *β*-フルクトフラノシダーゼの改変による 1-ケストース生産能向上と改変酵素の構造解析**
15:05 ○長屋美香[1], 平野勝紹[2], 藤井　匡[2], 栃尾　巧[2], 西河　淳[1], 殿塚隆史[1]（[1]東京農工大院農, [2]物産フードサイエンス研究開発セ）

2A26p07 ***Penicillium multicolor* が生産する 3 種の *p*-nitrophenyl *β*-D-glucopyranoside 分解酵素が触媒する L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性の比較研究**
15:16 ○小出麻奈[1], 菅沼笙子[2], 仁戸田照彦[2], 神崎　浩[2]（[1]岡山大・農, [2]岡山大院・環境生命）

2A26p08 **ゲノムマイニングによって取得した麹菌由来の新規キシラナーゼ（XynB）の酵素学的諸性質**
15:27 ○渡部　昭, 小幡公平, 太田夏野子, 氏家成隆, 新谷尚弘, 五味勝也（東北大院・農・生物産業創成）

2A26p09　シロアリ腸内共生細菌由来 GH11 キシラナーゼの生産と機能解析
15:38 ○北本真理奈[1]，徳田　岳[2]，渡辺裕文[3]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]琉球大・熱生研，[3]農研機構・生物研）

2A26p10　ヒト腸内細菌 *Bacteroides plebeius* 由来の変異型キシラナーゼ 10B（Xyn10B）の特性解析
15:49 ○大村佳孝[1]，松本貴良[2]，小黒弘貴[1]，林　秀謙[1,2]（[1]前工大院工，[2]前工大工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A26p11　*Euglena gracilis* Z 由来 β-1,3-oligoglucan phosphorylase ホモログの機能解析と比較
16:10 ○中越麻里菜，谷　修二，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環）

2A26p12　組換えヒト膵臓 α-アミラーゼ（rHPA）の大腸菌発現，諸性質および活性に対する阻害物質の効果
16:21 ○小根田洋史（長田産業株式会社）

2A26p13　リュウキュウイノモトソウ由来 LysM ドメイン多連結体および多連結体融合キチナーゼの抗真菌活性
16:32 ○高島智也[1]，砂川　陵[2]，上地敬子[2]，平良東紀[2]（[1]鹿児島大院連農，[2]琉球大農）

2A26p14　ガジュマル乳液由来キチナーゼ（GlxChiB）と *Bacillus circulans* KA304 由来キチナーゼ（FnChiI）の抗真菌活性における各ドメインの役割
16:43 ○神初　弾[1]，矢野成和[2]，上地敬子[1]，平良東紀[1]（[1]琉球大・農，[2]山形大院・理工）

2A26p15　"*Cellulosimicrobium* sp. NTK2" が生産する菌体外キチン分解酵素の解析
16:54 ○仁木大輔[1]，美藤友博[2]，清水克彦[3]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農，[3]鳥取大産学）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A26p16　Amino acid residues to govern substrate recognition of trehalose-6-phosphate hydrolase from *Streptococcus mutans* NBRC13955
17:15 ○Patcharapa KLAHAN，Masayuki Okuyama，Asako Kikuchi，Takayoshi Tagami，Atsuo Kimura（Grad Sch Agri, Hokkaido Univ）

2A26p17　古細菌トレハラーゼの N 末端領域の機能
17:26 ○坂口政吉[1]，久米杏奈[1]，湯浅充洋[1]，本田翔太郎[1]，小山文隆[1]，川喜田正夫[2]（[1]工学院大先進工，[2]東京都医学研）

2A26p18　*Klebsiella pneumoniae* pullulanase と cyclodextrin の相互作用様式の解明
17:37 ○坂　直樹[1]，田中啓一郎[2]，山野小波[2]，水谷公彦[1]，高橋延行[1]，岩本博行[2]，三上文三[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]福山大・生命工）

2A26p19　希少糖 D-allose を基質とするイネ由来ヘキソキナーゼ 6 の X 線結晶解析
17:48 ○吉田裕美[1,3]，松平一志[2]，望月　進[3]，何森　健[2,3]，秋光和也[2,3]，神鳥成弘[1,3]（[1]香川大・総合生命研究セ・医，[2]香川大・農，[3]香川大・国際希少糖研究教育）

A27 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物― 一次代謝，二次代謝 ―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A27a01　酵母を用いたナリンゲニン 7-*O*-グルコシド *in vivo* 生産における内在性 β-グルコシダーゼ遺伝子破壊の効果
9:00 ○大橋貴生，窪村有紗，三﨑　亮，藤山和仁（阪大生国セ）

2A27a02　ダイズイソフラボン生合成におけるメタボロン形成
9:11 ○和氣駿之，大豆田亮，高橋征司，中山　亨（東北大院工）

2A27a03　キンギョソウにおけるカルコン合成酵素の機能解析
9:22 和氣駿之，○寺下美穂，中野拓也，高橋征司，中山　亨（東北大院工）

2A27a04　陸上植物における EFP（enhancer of flavonoid production）の機能の普遍性
9:33 和氣駿之[1]，○山田彩友美[1]，大豆田亮[1]，中野拓也[1]，森田裕将[2]，榊原圭子[3]，星野　敦[4]，高橋征司[1]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]名城大農，[3]理研CSRS，[4]基生研）

2A27a05　カンキツ類由来のフラボノイド-*C*-配糖化酵素の温度安定性の解析
9:44 ○山岸由起子[1]，水藤史明[2]，新井亮一[1,3]，田口悟朗[1,3]（[1]信州大院・総合理工，[2]東大院・新領域，[3]信州大・繊維）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A27a06　シロイヌナズナのフェノール性異物の配糖化には複数の配糖化酵素が関与する
10:05 ○八尾　惟[1]，下坂　誠[1,2]，田口悟朗[1,2]（[1]信州大院総合理工，[2]信州大繊維）

2A27a07　ダイズ根から分泌されるイソフラボンの根圏での動態解析とモデル化
10:16 ○奥谷芙季[1]，山崎由実[1]，濱本昌一郎[2]，二瓶直登[2]，西村　拓[2]，矢崎一史[1]，杉山暁史[1]（[1]京大・生存研，[2]東京大・院農生命科）

2A27a08　ダイズ根から分泌されるサポニンの解析
10:27 ○津野雄平[1]，藤松輝久[1]，遠藤圭二[1]，杉山暁史[2]，矢崎一史[2]（[1]花王㈱・生物科学研，[2]京都大学・生存研）

2A27a09　ヤセウツボの α-ガラクトシダーゼ阻害剤が発芽に与える影響
10:38 ○馬場敦也[1]，小川拓水[1]，杉本幸裕[2,3]，太田大策[1]，岡澤敦司[1,3]（[1]阪府大院生命，[2]神大院農，[3]JST/JICA・SATREPS）

2A27a10　ゼニゴケのアントシアン輸送能の生化学的解析
10:49 ○有坂亮汰[1]，井上健太郎[1]，渡辺文太[2]，久保浩義[1]，高梨功次郎[1,3]（[1]信州大・理，[2]京大・化研，[3]信州大・山岳研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A27a11　ダイズ由来 Glycoside hydrolase family 1 β-グルコシダーゼの網羅的な機能解析
11:10 ○山田えりか，和氣駿之，高橋征司，中山　亨（東北大院工）

2A27a12　ブロッコリスプラウト中の機能性成分の増強に関する研究
11:21 ○中西健太[1]，平井晶子[3]，中田光彦[3]，柳瀬笑子[1,2]（[1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生，[3]㈱サラダコスモ）

2A27a13　チューリップにおけるチューリッポシド B 変換酵素の分子多様性：葉由来アイソザイムの同定
11:32 ○野村泰治[1,2]，口田　亮[2]，酒本千穂[2]，北岡直樹[1,2]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]富山県大工・生物工）

2A27a14　チューリッポシド変換酵素の基質特異性の検討：基質アルコール部位の影響
11:43 ○二永　貴[1]，野村泰治[2]，北岡直樹[2]，加藤康夫[2]（[1]富山県大院・工，[2]富山県大・生工研セ）

2A27a15　チューリッポシド / チューリッパリン類の抗細菌活性の再評価
11:54 ○加藤康夫[1,2]，中川恵蔵[2]，近堂菜月[2]，北岡直樹[1,2]，野村泰治[1,2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]富山県大工・生物工）

A27 会場　午後の部（14:00〜17:05）

植物― 一次代謝，二次代謝 ―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A27p01　薬用植物ムラサキのシュートを用いた VIGS アッセイ系の確立に向けて
14:00 ○井坂夏海[1]，草野博彰[1]，増田　税[2]，下村講一郎[3]，矢崎一史[1]（[1]京大・生存研，[2]北大院・農，[3]東洋大院・生命科学）

2A27p02　ムラサキのシコニン生成時に発現する Short-chain dehydrogenase/reductase の機能解析
14:11 ○吉岡奈津子[1]，渡辺文太[2]，矢崎一史[3]，高梨功次郎[1,4]（[1]信州大・理，[2]京大・化研，[3]京大・生存研，[4]信州大・山岳研）

2A27p03　コーヒーノキにおける Purine Permease の発現及びカフェイン取り込み輸送解析
14:22　○掛川博文[1], 士反伸和[2], 永山秀佳[3], 荻田信二郎[3], 矢崎一史[1], 杉山暁史[1]　([1]京大・生存研, [2]神戸薬科大, [3]県立広島大)

2A27p04　コーヒー原種 *Coffea charrierana* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と解析
14:33　倉田陸朗[1], ポンセットバレリー[2], デコックアレキサンドラ[2], ○水野幸一[1]　([1]秋田県大生物資源, [2]IRD-モンペリエ DIADE)

2A27p05　ベラドンナ転写因子 AbERF の機能解析
14:44　○樋口みのり, 橋本　隆, 庄司　翼　(奈良先端大バイオ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A27p06　栽培種および野生種トマトにおける α-トマチン代謝酵素遺伝子の機能解析
15:05　○秋山遼太[1], 加藤純平[1], 李　栄宰[1], 渡辺文太[2], 中安　大[1], 小林　緑[1], 飯島陽子[3], 梅基直行[4], 村中俊哉[5], 杉本幸裕[1], 水谷正治[1]　([1]神戸大院・農, [2]京都大・化研, [3]神奈川工科大・栄養生命, [4]理研・CSRS, [5]大阪大院・工)

2A27p07　ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド生合成に関わる糖転移酵素の機能解析
15:16　○中安　大[1], リヒョンゼ[1], 刑部敬史[2], 刑部祐里子[2], 杉本幸裕[1], 村中俊哉[3], 水谷正治[1]　([1]神戸大院・農, [2]徳島大・生物資源産業, [3]大阪大院・工)

2A27p08　ハナビシソウにおけるイソキノリンアルカロイド生合成遺伝子の発現ネットワーク解析
15:27　○西田昇平[1], 山田泰之[2], 佐藤文彦[1]　([1]京大院生命, [2]神戸薬科大)

2A27p09　ウマノスズクサにおけるアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の探索と機能解析(II)
15:38　○松井俊樹, 佐藤文彦　(京大院・生命)

2A27p10　CYP71Z6 と CYP71Z7 の詳細な酵素機能
15:49　○北岡直樹[1], WU Yisheng[2], PETERS Reuben J.[2]　([1]富山県大工, [2]アイオワ州立大)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A27p11　みどりの香り組成を制御する酵素，ヘキセナール還元酵素の同定とその機能の解明
16:10　田中俊之[1], 池田彩菜[1], 志岐和美[1], 国広(長井)直子[1], 大和勝幸[2], 道羅英夫[3], 大西利幸[4], 肥塚崇男[1], ○松井健二[1]　([1]山口大院創成科学, [2]近畿大生物理工, [3]静岡大グリーン科技研, [4]静岡大農)

2A27p12　ビワの花の含窒素香気成分の生合成に関与するシトクロム P450 の探索と性状解析
16:21　○山口拓也[1], 松井祐美[2], 松本　宏[1], 桑原保正[3,4], 浅野泰久[3,4]　([1]筑波大・生命環境, [2]筑波大・生物, [3]富山県大工・生工研セ, [4]JST, ERATO)

2A27p13　ゴマのアントラキノン類生産における推定生合成中間体
16:32　○古本敏夫, 佐藤龍太　(香川大農)

2A27p14　オウレンのイソキノリンアルカロイド生合成系を制御する AP2/ERF 型転写因子の機能解析
16:43　○山田泰之[1], 西田昇平[2], 士反伸和[1], 佐藤文彦[2]　([1]神戸薬大, [2]京大院生命)

2A27p15　CRISPR/Cas9 system を用いたオウレンゲノム編集細胞の作製と一細胞解析
16:54　○浜　竜哉[1], 西尾　洋[1], 山田泰之[2], 佐藤文彦[1]　([1]京大・院　生命, [2]神戸薬科大)

A28 会場　午前の部(9:00〜11:54)

植物―植物ホルモン，成長調節物質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A28a01　トマトのソラナコール生合成における芳香環形成経路
9:00　○野上香奈[1], 米山香織[2], 野村崇人[3], 米山弘一[3], 秋山康紀[1]　([1]阪府大院・生命環境, [2]愛媛大院・農, [3]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)

2A28a02　ミヤコグサ 5DS 生合成における MAX1 下流経路の解析
9:11　○森　愛美[1], 米山香織[2], 謝　肖男[3], 野村崇人[3], 米山弘一[3], 秋山康紀[1]　([1]阪府大院・生命環境, [2]愛媛大院・農学, [3]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)

2A28a03　シダ植物におけるストリゴラクトン生合成
9:22　○依田彬義[1], 佐藤智康[1], 米山香織[2,3], 謝　肖男[1,2], 森　愛美[4], 秋山康紀[4], 横田孝雄[5], 米山弘一[2], 野村崇人[1,2]　([1]宇都宮大院・農, [2]宇都宮大・バイオ, [3]愛媛大・農, [4]大阪府立大院・生命環境, [5]帝京大・バイオ)

2A28a04　種子発芽におけるストリゴラクトン作用と転写因子 NF-YC の関連性
9:33　○石川尭彦, 池上佳菜子, 姜　凱, 高橋郁夫, 水野　翼, 中村英光　(東大農生科)

2A28a05　新規ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索
9:44　○伊藤晋作[1], 川田紘二郎[1], 新井美乃里[1], 佐藤美咲[1], 久家滉太[1], 佐々木康幸[1], 野村崇人[2], 浅見忠男[3], 矢嶋俊介[1]　([1]東農大バイオ, [2]宇都宮大, [3]東大院農生科応生化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A28a06　根寄生雑草 *Striga hermonthica* の多様な KAI2 ホモログの機能分担
10:05　○今村優作[1], 高橋郁夫[1], 福井康佑[1,2], 徐　玉群[1], 宮川拓也[1], 中村英光[1], 田之倉優[1], 浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化, [2]岡山理科大・理)

2A28a07　常温固体型エチレン様活性物質による農業被害低減効果の追究
10:16　○水野　翼[1], 財前穂波[1], 鈴木優志[1], 北畑信隆[2], 浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科, [2]東理大・理)

2A28a08　Integration of STH7 and BIL1 Moderate Strigolactone and Brassinosteroid Crosstalk on Light-adapted Development in *Arabidopsis*
10:27　○Jutiporn Thussagunpanit[1], Yuko Nagai[1], Takeshi Nakano[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1]　([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]CSRS, RIKEN)

2A28a09　非ステロイド型ブラシノライド様活性化合物 NSBR1 の構造変換
10:38　○松尾美登理[1], 青木孝憲[1], 杉浦愛理[1], 山上あゆみ[2], 中野雄司[2], 中川好秋[1], 宮川　恒[1]　([1]京大院農, [2]理研CSRS)

2A28a10　新規植物成長促進化合物 PPG の生理機能の解明とターゲット候補タンパク質の機能解析
10:49　○竹野　駿[1,2], 田中翔太[1,2], 山上あゆみ[1], 嶋田勢津子[1], 松井　南[1], 筧　雄介[3], 嶋田幸久[3], 瀬上紹嗣[4], 近藤恭光[1], 堂前　直[1], 久城哲夫[2], 前島正義[4], 浅見忠男[5,6], 長田裕之[1], 篠崎一雄[1], 中野雄司[1,6]　([1]理研・CSRS, [2]明治大院・農芸化学, [3]横浜市大, [4]名大院・生命農, [5]東大院・農生科・応生化, [6]CREST・JST)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A28a11　MD シミュレーションにより明らかとなったイネジベレリン代謝酵素の活性機構
11:10　○竹原清日[1], 三上文三[2], 桜庭　俊[3], 松岡　信[1], 上口(田中)美弥子[1]　([1]名大・生物機能セ, [2]京大院・農, [3]東大院・創域)

2A28a12　イネの DELLA タンパク質の構造解析への試み
11:21　○杉原諒彦, 竹原清日, 松岡　誠, 上口(田中)美弥子　(名大農)

2A28a13　原始ジベレリン様成長制御物質の同定
11:32　○宮崎　翔[1], 原万里穂[1], 伊藤晋作[2], 田中啓介[3], 松岡　信[4], 浅見忠男[1], 林謙一郎[5], 川出　洋[6], 中嶋正敏[1]　([1]東大院農生科, [2]東農大応生化, [3]東農大ゲノムセンター, [4]名大生物機能センター, [5]岡山理大理, [6]東京農工大院農)

2A28a14　下等植物から高等植物に至る *ent*-kaurene 合成酵素の機能進化
11:43　○福田和佳子[1],　宮崎　翔[1],　牧野晴香[1],　木村穂乃香[1], 貝沼遼介[1], 安藤朋子[1], 夏目雅裕[1], 野崎　浩[2], 林謙一郎[2], 川出　洋[1]　([1]東京農工大院農, [2]岡山理科大理)

A28 会場　午後の部(14:00〜17:59)

植物―植物ホルモン, 成長調節物質/植物栄養, 光合成, オルガネラ, 膜輸送―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A28p01　ゼニゴケ・ゲノムにおける植物ホルモン生合成・シグナル伝達系遺伝子
14:00　○山岡尚平[1], 西浜竜一[1], 石崎公庸[2], 大和勝幸[3], 河内孝之[1]　([1]京大・院・生命科学, [2]神戸大・院・理, [3]近大・生物理工)

2A28p02　ゼニゴケで唯一のオーキシン受容体遺伝子 Mp*TIR1* は発生に必要であるが細胞の生存には必須ではない
14:11　○鈴木秀政[1], 加藤大貴[1,2], 山岡尚平[1], 西浜竜一[1], 河内孝之[1]　([1]京大 院 生命, [2]Lab. Biochem., Wageningen Univ.)

2A28p03　Exploring the physiological functions of gibberellin-related diterpenes in the liverwort *Marchantia polymorpha*
14:22　○Rui SUN, Keisuke INOUE, Ryunosuke KUSUNOKI, Ryuichi NISHIHAMA, Shohei YAMAOKA, Takayuki KOHCHI (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

2A28p04　化合物による植物免疫の制御：新規免疫抑制剤 NAS1 の応用を指向した研究
14:33　○青木智史, 姜　凱, 徐　銀卿, 高橋郁夫, 宮崎　翔, 中村英光, 浅見忠男　(東大院・農生科・応生化)

2A28p05　多機能輸送体 NPF2.10 の基質選択制御に関する研究
14:44　○石丸泰寛[1], 及川貴也[1], 竹内優輔[1], 清水崇史[2], 瀬尾光範[2], 上田　実[1]　([1]東北大院理, [2]理研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A28p06　Theobroxide 処理に伴う植物の病原菌に対する抵抗力への影響
15:05　○長田憲幸, 松浦英幸, 高橋公咲, 増田　税, 犬飼　剛, 山下雄大　(北大院農)

2A28p07　ビール酵母由来の細胞壁溶液葉面散布によるバレイショ増収効果
15:16　○宮脇寛治[1], 北川隆徳[2], 柏木純一[1], 松浦英幸[1], 高橋公咲[1]　([1]北大農, [2]アサヒバイオサイクル㈱)

2A28p08　イネの 3 つの COI1 ホモログの機能解析
15:27　○宮本皓司[1], 稲垣秀生[1], 伊藤　響[1], 福本有貴[1], 矢島彩花[1], Xi Chen[2], 下里美由紀[1], ハセット絵美[1], 畠山幸大[1], 平栗優子[1], 石塚祐伸[1], 湯本絵美[1], 柴田恭美[1], 酒澤智子[1], 横田孝雄[1], 岡田憲典[3], 山根久和[1]　([1]帝京大・バイオ, [2]ブレーメン大学, [3]東大・生物工学セ)

2A28p09　蘚類におけるジャスモン酸類の探索と生理活性の追究
15:38　○照屋美優[1], 藤原　薫[1], 宮本皓司[2], 山根久和[2], 新屋友規[3], ガリスイバン[3],　林謙一郎[4],　宮崎　翔[5],　中嶋正敏[5],　野尻秀昭[1], 岡田憲典[1]　([1]東大・生物工学セ, [2]帝京大・バイオ, [3]岡山大・植物研, [4]岡山理大・理学部, [5]東大院・農生科)

2A28p10　発達中の小麦種子の植物ホルモンの一斉分析
15:49　松浦恭和, ○森　泉, 平山隆志　(岡山大学植物研)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A28p11　ベタシアニンを生産するクルメケイトウ培養細胞の超低温保存
16:10　○三國智葉, 茂木智浩, 栗山　昭　(東電大院理工)

2A28p12　イネ培養細胞が生産する生理活性物質
16:21　○福島　亮, 栗山　昭　(東電大院理工)

2A28p13　植物の色み改変能を持つ膜輸送体の探索
16:32　○永縄万由子, 木村ゆり, 武村みどり, 佐古建志, 前島正義, 中西洋一　(名古屋大院・生命農)

2A28p14　ピロリン酸が植物の形態形成と成長に与える影響の分子生物学的解析
16:43　○福田茉由[1], 瀬上紹嗣[1], Ferjani Ali[2], 前島正義[1]　([1]名大生命農, [2]東京学芸大教育)

2A28p15　葉緑体チラコイド膜に存在する新奇拡散チャネル TPOR の発見
16:54　○児島征司[1,2], 栃木佐枝子[2], 高橋秀幸[2]　([1]東北大・学際研, [2]東北大院・生命)

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A28p16　常温性と好熱性シアノバクテリア間のサブユニットスワップ型 RuBisCO の解析
17:15　○磯野香奈子, 蘆田弘樹　(神戸大・人間発達環境)

2A28p17　窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* におけるトランスポゾン変異導入系の確立と窒素固定的生育に異常を示す変異株の単離
17:26　○戸松千映[1], 上坂一馬[2], 山川壽伯[1], 土屋　徹[3,4], 井原邦夫[2], 藤田祐一[1]　([1]名古屋大院生命農, [2]名古屋大遺伝子実験施設, [3]京都大学院人間環境, [4]京都大学院地球環境)

2A28p18　Plant growth promoting effects of a single Rhodopseudomonas palustris inoculant
17:37　Shu-Hwa Hsu, Meng-wei Shen, Kai-Juen Lo, Huu-Sheng Lur, ○Chi-Te Liu　(Nat Taiwan Univ.)

2A28p19　水耕栽培用リン酸塩肥料の自動管理システムの設計と構築
17:48　○徐　克彬, 白井　理, 北隅優希, 加納健司　(京大院農)

A29 会場　午前の部(9:00〜12:05)

植物―環境応答, ストレス応答, 情報伝達, 分化―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A29a01　生物の代謝産物として植物で初めて見つかったリボフラビン(ビタミン B2)誘導体 (第 2 報)
9:00　○金子元優[1], 佐藤純一[1], 越野広雪[2], 田中啓介[8], 久保田恵理[8], 大竹留未[8], 関野滉太[1], 石井達也[1], 関　貴公[1], 土岡美穂[1], 吉澤夏美[1], 堀江結衣[1], 武田晃治[4], 勝田　亮[3], 吉村悦郎[5], 志波　優[7], 新町文絵[6], 川崎信治[1], 額田恭郎[3], 新村洋一[1]　([1]東農大応生科・バイオ, [2]理研CSRS, [3]東京農大・分子生命化学, [4]東京農大・教職, [5]放送大・教養, [6]日大短大・生物資源, [7]東京農大・分子微生物, [8]東京農大・ゲノム解析セ)

2A29a02　蛍光性ウメ花粉の発達異常の解析とそのミツバチ訪花行動への影響
9:11　○平井伸博[1],　森信之介[1],　新間秀一[2],　増子(鈴木)潤美[3], 渡辺正夫[3],　中西テツ[4],　月岡淳子[5],　後藤勝実[5],　福井宏至[6]　([1]京都大院農, [2]大阪大院工, [3]東北大院生命, [4]神戸大農, [5]京都薬大, [6]香川大農)

2A29a03　在来カンキツのストレス応答反応における二次代謝物質のプロファイリング
9:22　○伊佐木芳[1],　松川哲也[1,2],　梶山慎一郎[1]　([1]近畿大院生物理工, [2]近畿大附属農場)

2A29a04　スギの含有成分の分析
9:33　○伊ケ崎知弘, 菱山正二郎, 楠本倫久, 掛川弘一, 松井直之, 二村典宏, 大平辰朗　(森林総研)

2A29a05　傷害ストレスにより誘導されるゼニゴケの二次代謝産物に関する研究
9:44　○高橋公咲，　吉川麻友，　ルオウェイフェン，　小西結花，松浦英幸　（北大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A29a06　イネのファイトアレキシン生産における種内多様性
10:05　○小久保悠[1]，村田晃一[1]，假谷佳祐[1]，上野琴巳[1]，寺石政義[2]，奥本　裕[2]，森　直樹[2]，石原　亨[1]　（[1]鳥取大農，[2]京都大院農）
2A29a07　酵素凍結保護作用を示すデハイドリンのドメインに関する研究
10:16　○大久保智博[1]，神谷慶太[1]，亀山阿由子[1]，原　正和[1,2]　（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン研）
2A29a08　アブラナ科植物の自家不和合性におけるリガンド受容体複合体の結晶構造
10:27　○村瀬浩司[1]，森　智行[2]，劉　　瀟[2]，真坂知帆[2]，平野良憲[2]，浅野（下里）裕子[2]，高田美信[3]，渡辺正夫[3]，磯貝　彰[2]，箱嶋敏雄[2]，高山誠司[1]　（[1]東大院生科・応生化，[2]奈良先端大・バイオ，[3]東北大院・生命）
2A29a09　ナス科植物の自家不和合性に関わる S-RNase の X 線結晶構造解析
10:38　○辻田絵梨[1]，村瀬浩司[1]，平野良憲[2]，森　智行[2]，久保健一[1]，円谷徹之[3]，箱嶋敏雄[2]，高山誠司[1]　（[1]東大院生科・応生化，[2]奈良先端大・バイオ，[3]大阪大院・産業科学研究所）
2A29a10　シロイヌナズナの低温シグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング
10:49　○三原良太，稲葉靖子，稲葉丈人　（宮崎大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A29a11　シロイヌナズナ液胞ルーメンタンパク質の液胞輸送に関わる輸送モチーフの研究
11:10　○高畑周平[1]，久我一弘[2]，松波絵里香[1]，清水英寿[2]，地阪光生[2]，横田一成[2]，中川　強[1]，西村浩二[1]　（[1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]島根大・生物資源）
2A29a12　シロイヌナズナ PAMP 受容体の膜小胞輸送に関わる輸送モチーフの研究
11:21　○塚本真嗣[1]，常　愛花[2]，清水英寿[2]，地坂光生[2]，横田一成[2]，中川　強[1]，西村浩二[1]　（[1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]島根大・生物資源）
2A29a13　ソテツ（*Cycas revoluta*）雄花の発熱におけるシアン耐性呼吸酵素の役割と分子同定
11:32　○倉山侑也，山本知奈，片山陽子，稲葉靖子　（宮崎大農）
2A29a14　発熱植物ザゼンソウの葉由来プロトプラストを用いたシアン耐性呼吸酵素 AOX の解析
11:43　○前川春彦，溝口幸一郎，片山陽子，稲葉靖子　（宮崎大農）
2A29a15　玄米外観品質における高 CO_2 の影響
11:54　○若松　和[1]，　齋藤誠志[2]，　猪俣拓也[1]，　金古堅太郎[2]，Baslam Marouane[2]，　三ツ井敏明[1,2]　（[1]新潟大院，自然科学，[2]新潟大農，応生化）

A29 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A29p01　トマトの有機栽培における最適な土壌条件の確立
14:00　○朴木慎治[1]，小橋勇也[2]，ADHIKARI Dinesh[1]，荒木希和子[1]，久保　幹[1]　（[1]立命館大生命，[2]立命館大院生命）
2A29p02　植物の連作障害を軽減するウルトラファインバブル水の効果
14:11　○横山峰幸[1]，山下貴敏[2]，田中和広[2]，瀬尾茂美[3]，阿部貞夫[4]，土屋好司[1]，酒井秀樹[5]，朽津和幸[1]　（[1]東理大理工，[2]㈱田中金属，[3]農研機構生物機能利用研究部門，[4]㈱ヨシカ，[5]東理大総研）
2A29p03　好熱菌発酵産物が抗酸化機能を有する人参の生産性と機能性に与える影響評価
14:22　○松浦真紀子[1,2]，　宮本浩邦[1,2,3]，　松下映夫[2]，　石井千歳[2]，中熊映乃[2]，小野瀬暁[2,4]，児玉浩明[1]，澤田有司[5]，平井優美[5]，茂田勝美[6]（[1]千葉大・園芸，[2]㈱サーマス，[3]理研・IMS，[4]京葉プラントエンジニアリング㈱，[5]理研・環境資源CSRS，[6]タキイ種苗）
2A29p04　枯草菌由来の環状リポペプチドによるシロイヌナズナの病害抵抗性誘導応答
14:33　○椎名繁晶[1]，梶川揚申[2]，五十君靜信[2]，篠原弘亮[3]，横田健治[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生科，[3]東農大農）
2A29p05　タバコ懸濁細胞に対するエリシター処理によって誘導される細胞壁タンパク質の変動
14:44　○中村優子，宮下正弘，宮川　恒　（京都大学大学院農学研究科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A29p06　イネの Ca^{2+}-依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構
15:05　○土本尚輝[1]，神村麻友[2]，榊原悠大[2]，倉林　諒[2]，蔡　晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ）
2A29p07　フラジェリン分子の異なるエピトープを認識する植物免疫システムの解析
15:16　○村上貴彦[2]，今尾優吾[2]，桂木雄也[1]，平井洋行[1]，古川岳人[1]，蔡　晃植[1,2]　（[1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大学院・バイオ）
2A29p08　H_2O_2 プライミングはイネの高温不稔と品質低下を改善する
15:27　○流石有希子[1]，三井悠大[1]，金古堅太郎[2]，Baslam Marouane[2]，三ツ井敏明[1,2]　（[1]新潟大院自然研，[2]新潟大農）
2A29p09　H_2O_2 代謝ネットワークを介した植物の光ストレス応答機構
15:38　○三冨　弦，菊樂香奈，寺井佑介，小川貴央，石川孝博，丸田隆典　（島根大・生資科・生命工）
2A29p10　シロイヌナズナにおけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素のアスコルビン酸再生への寄与
15:49　○寺井佑介，上野祐美，小川貴央，石川孝博，丸田隆典　（島根大・生資科・生命工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A29p11　イネのストレス誘導型プレニルニリン酸合成酵素遺伝子の発現制御機構
16:10　○和田美樹[1]，冨山詩歩[1]，田渕雄夢[1]，吉田悠里[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2]，　森　昌樹[3]，　野尻秀昭[1]，　岡田憲典[1]　（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ，[3]農研機構・生物機能利用研究部門）
2A29p12　イネの転写因子 DPF は非生物的ストレス誘導的なジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に関与している
16:21　石川一輝[1,2]，山村千紘[1,2]，田渕雄夢[3]，前田　哲[1]，岡田憲典[3]，鎌倉高志[2]，○森　昌樹[1]　（[1]農研機構・生物機能利用研究部門，[2]東理大院・理工，[3]東大・生物生産工学研究センター）
2A29p13　乾燥ストレス耐性植物の成長促進制御
16:32　○工藤まどか[1]，　城所　聡[1]，　吉田拓也[1,2]，　溝井順哉[1]，戸高大輔[1]，FERNIE Alisdair[2]，篠崎一雄[3]，篠崎和子[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]マックスプランク研究所，[3]理研・環境資源）
2A29p14　主成分分析と併用した蛍光スペクトルによる植物生育状態モニタリング
16:43　○藤田洋志[1]，植松寛暁[2]，土田夏帆[2]，城所美紀[2]，菊地俊介[1]，安保　充[2]　（[1]明治大院農，[2]明治大農）
2A29p15　自家不和合性ペチュニアの花粉側因子 SLF の分子系統学に基づいた認識標的の予測
16:54　○久保健一[1]，藤井壮太[1]，村瀬浩司[1]，辻田絵梨[1]，円谷徹之[2]，高山誠司[1]　（[1]東京大・農学生命科学研究科，[2]大阪大・産業科学研）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A29p16　植物根端における細胞外マトリクス中の DNA 分析
17:15　○須山隆大[1], 大坪未侑[2], 高橋契匠[2], 加藤　愛[3], 藤井紳一郎[3], 安保　充[2]　([1]明治大院農, [2]明治大農, [3]産総研計測標準)

2A29p17　植物根細胞外 ROS とボーダー細胞を用いたストレス応答評価
17:26　○伊藤洋輔[1], 矢澤正道[2], 菊地俊介[1], 安保　充[2]　([1]明大院農, [2]明大農)

2A29p18　根毛と種子を護る細胞壁タンパク質 SRPP の分子生理学的解析
17:37　○鵜野　裕[1], 田中奈月[1,2], 佐藤良介[1], 前島正義[1]　([1]名大院・生命農, [2]オックスフォード大)

2A29p19　高等植物の二次肥厚を支える側方分裂組織の活性維持機構の解明
17:48　○島田由里菜, 今村美友, 古川博規, 山篠貴史　(名古屋大生命農)

2A29p20　植物時計の振動特性を支えるエピジェネティック制御機構の解析
17:59　高田祐輔, 古川博規, 嶺野雄登, 今村美友, ○山篠貴史　(名古屋大農)

B02 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B02a01　Flavan 3-ols の代謝亢進作用の解明
9:00　○大矢さとみ[1],　神野将希[1],　難波文男[2],　戸田登志也[2], 越阪部奈緒美[1]　([1]芝工大 生命, [2]フジッコ株式会社)

2B02a02　フラボノールによるグルコース取り込み促進効果には B 環のカテコール構造が重要である
9:11　○綾　恵弥, 白鞘大志, 山下陽子, 芦田　均　(神戸大院農)

2B02a03　Kaempferol ameliorates glucose uptake via AMPK- and JAK/STAT-pathways in L6 myotubes
9:22　○Hao Jiang,　Yasukiyo Yoshioka,　Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida　(Kobe Univ.)

2B02a04　筋肉細胞において GLUT4 の細胞膜移行を促進させる EGCg の標的分子探索
9:33　○池田真規, 芦田　均　(神戸大院農)

2B02a05　フラボノイド Chrysin による SREBP を介した脂質合成抑制効果の解析
9:44　○岩瀬将盛, 清水　誠, 井上　順, 佐藤隆一郎　(東大院農生科応生化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B02a06　貧血を伴わない鉄欠乏状態と高ショ糖食摂取の組み合わせによる肝臓脂質蓄積
10:05　○堀　将太[1], 常木生也[1], 花井健人[1], 清水英寿[2], 原　博[1], 石塚　敏[1]　([1]北大・院農, [2]島根大・生資)

2B02a07　脂肪性肝疾患モデルへのタウリン摂取の影響
10:16　○宮田昌明, 舩木萌浩, 福原千晶, 住屋佑希乃, 杉浦義正　(水大校食品)

2B02a08　Study on food factors that regulate bile acid metabolism
10:27　○Tzuwen HONG, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO　(Tokyo Univ.)

2B02a09　生理的濃度における pyrroloquinoline quinone(PQQ)のミトコンドリア新生促進作用の解析
10:38　○小川満利子[1], 才原一浩[2], 池本一人[3], 内田浩二[4], 赤川　貢[2] ([1]大阪府大・生命環境, [2]大阪府大院・生命環境, [3]三菱ガス化学㈱, [4]東大院・農学生命)

2B02a10　Kinase 阻害剤がミトコンドリア生合成に及ぼす作用
10:49　望月祐介[1], ○守田昭仁[1], 竹内彩夏[1], 長池祐太[1], 小郷尚久[1], 浅井章良[1],　亀井康富[2],　三浦進司[2]　([1]静岡県立大学,　[2]京都府立大学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B02a11　遊離脂肪酸受容体を活性化する食品成分の探索
11:10　○下村沙也子[1], 井上飛鳥[2], 青木淳賢[2], 内田浩二[3], 柴田貴広[1] ([1]名大院生命農, [2]東北大院薬, [3]東大院農学生命)

2B02a12　鰹出汁摂取による血中アディポネクチン濃度の上昇
11:21　○住澤知之　(鹿児島女子短大食物栄養)

2B02a13　ピペリンは ROS を介して AMPK を活性化しグルコース取り込みを促進する
11:32　○前田歩海[1], 吉岡泰淳[2], 山下陽子[1], 芦田　均[1]　([1]神戸大院・農, [2]神戸大院・科技イノベ)

2B02a14　血糖調節機能を有する卵殻膜由来ペプチドの探索
11:43　○高　越[1], 吉岡泰淳[2], 芦田　均[1]　([1]神戸大院農, [2]神戸大院科技イノベ)

2B02a15　筋肉への糖取り込み促進効果を持つナツメグ抽出物中の関与成分の検討
11:54　○河野龍之進[1], 前田歩海[1], 吉岡泰淳[2], 山下陽子[1], 芦田　均[1] ([1]神戸大院農, [2]神戸大院科技イノベ)

B03 会場　午前の部(9:00〜11:21)

食品―食品機能・栄養 - 糖質代謝/食品工学 - その他

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B03a01　異なる植物油を用いた O/W エマルションの冷解凍に伴う不安定化挙動
9:00　○遅沢優大[1], 吉田茉央[1], 宮川弥生[1], 安達修二[2], 谷　史人[1] ([1]京大院農, [2]京都学園大バイオ)

2B03a02　「さつま砂糖漬け鯛」製造法における味噌漬け処理の品質へ及ぼす影響
9:11　○福田　翼, 内山晃一, 嵩慎太郎, 辰野竜平, 古下　学, 前田俊道　(水産機構水産大)

2B03a03　日本水稲品種群における米胚乳酵素活性と炊飯米品質との関係
9:22　○堀　清純[1],　飯島　健[1],　木村圭一[2],　小俣衣央梨[2], 仁木沙都美[2], 江花薫子[3], 鈴木啓太郎[1], 辻井良政[2], 高野克己[3]　([1]農研機構作物開発センター, [2]東京農業大学, [3]農研機構遺伝資源センター)

2B03a04　プラズマベースイオン注入法を用いた *Bacillus stearothermophilus* の殺菌におけるパルス幅の最適化
9:33　○角川幸治[1], 薬師寺亜耶[1], 山城朱音[1], 水胤友宏[2], 狩野卓也[3], 田中　武[2]　([1]広島工大生命, [2]広島工大院工学, [3]広島工大工学)

2B03a05　Visualizing metabolites in rice koji using MALDI imaging mass spectrometry
9:44　○Adinda Putri WISMAN, Eiichiro FUKUSAKI, Shuichi SHIMMA　(Osaka Univ.)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B03a06　ピペコリン酸とトリゴネリンが筋管細胞の糖取り込みならびにラットの耐糖能に及ぼす影響
10:05　○高橋　徹, 沖浦　文　((公財)東洋食品研究所)

2B03a07　植物性食品素材由来の α-グルコシダーゼ阻害物質の探索
10:16　○濱田麻衣佳, 矢野善久, 深見治一, 藤田裕之　(京都学園大学)

2B03a08　2 型糖尿病モデルマウスにおける熟成ニンニク抽出液の高血糖に対する作用
10:27　○三木里美, 猪熊健一, 高嶋美由希, 牛島光保, 鈴木順一朗, 森原直明　(湧永製薬株式会社)

2B03a09　宿儺かぼちゃ摂取はラット盲腸 *n*-酪酸を増加させ，盲腸と尿中のフェノールと *p*-クレゾールを低減化する
10:38　○中村日南[1]，尾嶋由梨[2]，袖垣一也[3]，水野文敬[3]，宮本善秋[3]，石橋裕也[3]，　鈴木　徹[1,2]，　中川智行[1,2]，　中村浩平[1,2]，　島田昌也[1,2]，稲垣瑞穂[1,2]，　早川享志[1,2]　([1]岐阜大学応用生物科学研究科，[2]岐阜大学応用生物科学部，[3]岐阜県中山間農業研究所)

2B03a10　プロシアニジンの高血糖抑制効果とその作用機構についての比較検討
10:49　○山下陽子[1]，津田孝範[2]，芦田　均[1]　([1]神戸大院農，[2]中部大応用生物)

a11 発表者の接続時間 11:00～11:10

2B03a11　麹菌を用いた発酵によるリンゴ未熟果のデンプン分解酵素阻害活性の向上
11:10　○井澤弘美，小川千紗，鈴木　菜，舘花春佳，乗鞍敏夫，今　　淳　(青森県立保健大)

B04 会場　午前の部(9:00～12:05)

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

2B04a01　外因性酸化コレステロールの体内動態及び蓄積性の検討
9:00　○中堀紘花，加藤慧士，長田恭一　(明治大農)

2B04a02　ヒト酸化 LDL 受容体のグルカン結合活性
9:11　○武藤愛里[1]，原田悠宇[2]，福村　藍[1]，安藤　郷[1]，堀　公法[2]，岡村璃沙[2]，木落信郎[1]，奥村裕紀[1,2]，氏田　稔[1,2]　([1]名城大院農，[2]名城大農)

2B04a03　組換えヒト酸化 LDL 受容体の糖結合特異性
9:22　○原田悠宇[1]，武藤愛里[2]，福村　藍[2]，安藤　郷[2]，堀　公法[1]，岡村璃沙[1]，木落信郎[2]，奥村裕紀[1,2]，氏田　稔[1,2]　([1]名城大農，[2]名城大院農)

2B04a04　機能性リン脂質がリポ蛋白質代謝関連遺伝子に及ぼす影響
9:33　○藤盛和子[1]，山﨑裕也[2]，杉山　楢[2]，滋野浩一[2]，前場良太[3]，原　　博[4]，西向めぐみ[1]　([1]岩手大農，[2]㈱ADEKA，[3]帝京大医，[4]北大院農)

2B04a05　ホスファチジルコリン摂取後のリンパ液中サイトカイン濃度
9:44　○武山　藍，城内文吾，河内明日香，有馬優子，佐藤匡央　(九大院・農)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

2B04a06　テアフラビンの胆汁酸トランスポーター阻害機構の解明
10:05　○宮脇里奈[1]，石川和樹[2]，石井剛志[3]，小川真奈[2]，小林彰子[2]　([1]東大農，[2]東大院農，[3]神戸学院栄)

2B04a07　マヌカ蜂蜜に含まれるレプトスペリン及びメチルシリンゲートの培養細胞を用いた代謝研究
10:16　○加藤陽二[1,2]，　室田佳恵子[3]，　石坂朱里[1,2]，　伊藤美紀子[1,2]，生城真一[4]　([1]兵庫県大環境人間，[2]兵庫県大先端食セ，[3]近大理工，[4]富山県大工)

2B04a08　*Calluna vulgaris* からの α-グルコシダーゼ発現量抑制物質の探索
10:27　○野田耕太，加藤英介，川端　潤　(北大院農)

2B04a09　かつお節由来 DPPIV 阻害ペプチドの単離・同定及び機能性・吸収性評価
10:38　○山本晃久[1]，関　英治[3]，藤原佳史[3]，薩　秀夫[2]　([1]前工大院・工，[2]前工大・工，[3]ヤマキ㈱)

2B04a10　尿酸トランスポーターを制御する食品成分探索評価系の構築
10:49　○近藤泰嗣，諏訪竣亮，薩　秀夫　(前工大・工)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

2B04a11　マウス摘出腸管におけるキャベツ酢による糖吸収抑制作用について
11:10　○寺島和哉[1]，石原　智[2]，唐木晋一郎[3]，本間知夫[1]　([1]前橋工科大院生物工学，[2]群馬県農業技術センター，[3]静岡県立大食品栄養)

2B04a12　ラット胸管リンパカニュレーション試験による γ-オリザノールの腸管吸収の評価
11:21　○小林エリ[1]，伊藤隼哉[1]，澤田一恵[2]，橋本博之[2]，加藤俊治[3]，永塚貴弘[1]，池田郁男[1]，宮澤陽夫[1,4]，仲川清隆[1]　([1]東北大院農，[2]築野食品工業㈱，[3]東海大医，[4]東北大未来科学技術共同研究セ)

2B04a13　^{15}N 標識法を利用した 1-デオキシノジリマイシンの吸収排泄動態の解明
11:32　○高須蒼生[1]，木村俊之[2]，田中福代[3]，山岸賢治[2]，伊藤隼哉[1]，池田亮一[4]，　宮澤陽夫[1,5]，　仲川清隆[1]　([1]東北大院農，[2]農研機構食品研究部門，[3]農研機構中央農研，[4]旭松食品㈱，[5]東北大未来科学技術共同研究セ)

2B04a14　*Lactobacillus paracasei* A221 がケンフェロール配糖体の吸収性に与える影響
11:43　○下条洋輔[1]，小澤裕介[2]，戸田年彦[2]，位上健太郎[1]，野渕　翠[1]，伊藤久富[1]，清水孝彦[2]　([1]㈱ナガセビューティケァ，[2]千葉大学)

2B04a15　Enhancement of a quercetin glucoside absorption by water-soluble dietary fibers in rats.
11:54　○Aphichat TRAKOONCHAROENVIT，　Hiroshi HARA　(Hokkaido Univ.)

B05 会場　午前の部(9:00～12:05)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

2B05a01　べにふうき緑茶と糖転移ヘスペリジンの機能性フードペアリング
9:00　○吉本孝憲[1]，藤野小夏[1]，篠田有希[2]，岡田賢次[2]，藤村由紀[1]，立花宏文[1]　([1]九大院農院・生機科，[2]アサヒ飲料㈱)

2B05a02　アレルギーからの回復に対するイチジク茶の影響
9:11　○阿部竜也，　西村耕作，　橋本ゆかり　((公財)東洋食品研究所)

2B05a03　アレルギー性疾患モデルにおけるチシャトウおよびその含有成分の効果
9:22　○杉本幸雄[1]，坪井駿尚[1]，稲垣勇翔[1]，武田侑子[1]，藤本啓太[1]，藤原克成[1]，　趙　秋娥[2]，　川脇美祐[3]，　土海ちあき[3]，　我如古菜月[3]，伊東秀之[3]，　佐伯綾希子[4]，　林　泰資[4]　([1]岡山大薬，[2]大森ヘルスケア，[3]岡山県立大，[4]ノートルダム清心女大)

2B05a04　西ノ島町産の褐藻ツルアラメに含まれる抗アレルギー成分の単離・同定
9:33　○杉浦義正[1]，木下陽一[2]，山谷裕昭[3]，中西正美[4]，平田文久[4]，林　裕一[5]，勝崎裕隆[6]，村瀬　昇[1]　([1]水産機構水大校，[2]西ノ島町，[3]ノア隠岐，[4]JFしまね，[5]岡部㈱海洋事業部，[6]三重大院生物資源)

2B05a05　Anti-allergy Effects of plantase-treated Zizania latifolia Extract in IgE-stimulated RBL-2H3 cells
9:44　○Jae-Yeul Lee[1]，Seun-Ah Yang[2]　([1]Department of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, [2]Major in Food Science and Technology, Keimyung University)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

2B05a06　乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 による 制御性 T 細胞誘導メカニズム
10:05　○顧　文亭[1]，宇野　智[1]，香西海音[1]，森永真実子[1]，高野智弘[1]，平出恵利華[1]，　内田健治[2]，　鳥居剛史[2]，　元島英雅[2]，　片野直哉[2]，足立(中嶋)はるよ[1]，　八村敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]よつ葉乳業㈱・中央研)

2B05a07　吉草酸-GPR109a 経路はエイコサノイドの産生を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する
10:16 ○藤垣　泉[1]，笠倉和巳[1]，久保允人[2]，八代拓也[1]，西山千春[1]（[1]東理大基工，[2]東理大生命研）

2B05a08　Notch シグナルの腸管マスト細胞分化への寄与とその阻害による食物アレルギー症状の緩和
10:27 ○中野信浩[1]，本庄明日香[1]，西山千春[1,2]，奥村　康[1]，小川秀興[1]（[1]順天堂大院・医，[2]東京理科大・基礎工）

2B05a09　高脂肪食食餌条件が T 細胞を介した食品アレルギー反応へ与える影響
10:38 ○本田真澄[1]，津田真人[1]，高橋恭子[1]，足立(中嶋)はるよ[2]，八村敏志[2]，細野　朗[1]（[1]日大・生資科，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

2B05a10　リアルタイム PCR を用いた食物アレルゲンコンポーネント解析
10:49 ○河合菜月[1]，岡崎史子[2]，村上友貴絵[3]，谷内昇一郎[4]，西野昌光[5]，犬尾千聡[6]，近藤康人[7]，松本晋也[1]，成田宏史[1]（[1]京女大食物，[2]龍谷大食物，[3]京都栄医専，[4]愛仁会高槻病院，[5]愛仁会千船病院，[6]聖マリアンナ医大，[7]藤田保健衛生医大）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B05a11　プロシアニジン B2 ガレートによる免疫調節作用の解析
11:10 ○田中沙智，古屋花暖，山本佳奈，真壁秀文（信州大農）

2B05a12　Caco-2 細胞における Engelhardtia chrysolepis 由来アスチルビンの腸管バリア機能の増強
11:21 ○中原達雄，西谷洋輔（丸善製薬株式会社）

2B05a13　加齢によるマウス腸管内ケモカインとそのレセプター発現の変化
11:32 ○長房秀幸[1]，賀　　軍[1]，武田安弘[2]，茶山和敏[1]（[1]静岡大院農，[2]森永健康栄養研）

2B05a14　光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発
11:43 ○數村公子[1]，竹内康造[1]，波多野薫子[1]，土屋広司[1]，美和登志幸[1]，服部将貴[2]，森下直計[3]，近藤房宣[3]，大澤俊彦[4]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]浜松ホトニクス・開発本部，[3]浜松ホトニクス・電子管，[4]愛知学院大・心身）

2B05a15　腸管上皮細胞における TLR4 遺伝子の DNA メチル化誘導機構
11:54 ○楢林ひかり，添田　譲，倉岡克弥，中田一彰，中西祐輔，花澤重正，高橋恭子（日大生物資源）

B05 会場　午後の部(14:00〜18:10)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B05p01　*Lactococcus lactis* JCM 5805 経口投与による皮膚免疫活性化と黄色ブドウ球菌感染防御効果
14:00 ○辻　亮平[1]，藤井敏雄[1]，谷澤かみゆ[1]，山田小百合[1]，松岡悠美[2]，金内　理[1]（[1]キリン㈱健康研，[2]千葉大医）

2B05p02　*Lactococcus lactis* JCM 5805 含有食品摂取が健常な成人皮膚へ及ぼす効果
14:11 ○藤井敏雄[1]，藤友　崇[2]，辻　亮平[1]，加藤悠希子[1]，澤井典子[2]，松岡悠美[3]，植松　智[4]，金内　理[1]（[1]キリン株式会社健康技術研究所，[2]DeNA ライフサイエンス，[3]千葉大学医学部皮膚科，[4]千葉大学大学院医学研究院・粘膜免疫学）

2B05p03　味噌より分離した *Tetragenococcus halophilus* の免疫調整機能
14:22 ○熊澤利彦[1,2]，西村篤寿[1]，浅井紀之[1]，安達貴弘[2]（[1]イチビキ㈱，[2]東京医科歯科大・難研）

2B05p04　OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトが発揮する免疫賦活作用のメカニズム解析
14:33 ○牧野聖也[1]，千葉芳香[1]，竹田和由[2]，狩野　宏[1]（[1]株明治乳酸菌研，[2]順天堂大医）

2B05p05　免疫賦活能を有する *Leuconostoc mesenteroides* 由来菌体外多糖の合成に関わる酵素の遺伝子解析と機能解析
14:44 ○松崎千秋[1]，中島由香里[1]，青木美優[1]，苫米地祐輔[2]，糸乗　前[3]，山本憲二[1]，久　景子[4]（[1]石川県大資源研，[2]東海大工，[3]滋賀大教育，[4]日東薬品工業）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B05p06　*Lactobacillus plantarum* OLL2712 株による腸管免疫系樹状細胞における IL-10 産生誘導効果
15:05 ○遠藤龍之助[1]，高野智弘[1]，WANG YIMEI[1]，利光孝之[2]，足立(中嶋)はるよ[1]，八村敏志[1]（[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]㈱明治・研究本部　乳酸菌研）

2B05p07　*Pediococcus acidilactici* K15 株のヒト B 細胞に対する IgA 産生誘導効果
15:16 ○碇　菜穂[1]，川島忠臣[1]，久保田芳郎[2]，小渡康行[3]，下条直樹[4]，辻　典子[5]（[1]キッコーマン㈱研究開発本部，[2]キッコーマン㈱キッコーマン総合病院，[3](公財)愛世会愛誠病院　上野クリニック，[4]千葉大院　医学研究院　小児病態学，[5]産総研　バイオメディカル研究部門）

2B05p08　カタクリ草(*Erythronium japonicum* Decne.)によるマクロファージにおける炎症抑制作用の遺伝子発現解析
15:27 ○岩間直子[1]，小堀真珠子[2]，本多和茂[3]（[1](地独)青森産技セ弘前研，[2](国研)農研機構食品研，[3]弘前大農学生命）

2B05p09　マクロファージモデル細胞における IL-12 発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析
15:38 ○梅谷華奈[1]，本田瑞希[2]，鈴木政彦[3]，辻川勇冶[3]，坂根　巌[3]，提坂裕子[3]，萩原彼方[1]，林　秀謙[1]，薩　秀夫[1]（[1]前工大・工，[2]前工大院・工，[3]㈱伊藤園・中央研究所）

2B05p10　食品アレルギー誘導時に観察される肺組織における活性化 $CD4^+$ T 細胞と顆粒球の増加
15:49 ○高橋　輝，津田真人，細野　朗（日大生資科・食品生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B05p11　ナリンゲニンは TNF-α 抑制とバリア回復を介して腸管炎症を回復させる
16:10 ○茶園悠太，鈴木卓弥（広島大学）

2B05p12　FBP1 は 2 つの異なる作用を介して腸管上皮バリア機能の維持に関わる
16:21 ○宮下采佳，藤村直人，小早川哲朗，中田一彰，中西祐輔，花澤重正，高橋恭子（日大生物資源）

2B05p13　腸管上皮透過性を亢進させる低分子量 GTP アーゼ ARF4 の発現分布と役割
16:32 ○中田一彰，村松芳樹，杉　由高，楢林ひかり，中西祐輔，津田真人，細野　朗，上野川修一，花澤重正，高橋恭子（日本大学生物資源科学部）

2B05p14　Down-regulation of *Cd14* expression in liver by ingestion of megalo-type isomaltosaccharides might be prerequisite for amelioration of LPS-induced liver injury in rats
16:43 ○Ga Hyun Joe[1]，Takahisa Iizuka[2]，Yoshinori Fujimoto[2]，Atsuo Kimura[1]，Hiroshi Hara[1]，Satoshi Ishizuka[1]（[1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan, [2]Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., Shizuoka, Japan）

2B05p15　マクロファージ炎症応答に対するライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol の抗炎症作用
16:54 ○河合咲紀[1]，上原　華[1]，佐藤道夫[1]，長田恭一[1]，高成　準[2]，北舘健太郎[2]（[1]明治大・農・農化，[2]㈱アミノアップ化学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B05p16　腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成抑制機構
17:15 ○池谷彩花[1]，雑賀有香[1]，笠倉和巳[1,2]，堀　大峰[1]，中西祐輔[1]，花澤重正[1]，高橋恭子[1]（[1]日大生資，[2]東京理科大基礎工）

2B05p17　腸管粘膜マスト細胞の特徴
17:26 ○堀　大峰，石川裕子，池谷彩花，中西祐輔，花澤重正，高橋恭子　（日本大学生物資源科学部）

2B05p18　酵素合成グリコーゲンは RBL-2H3 細胞における脱顆粒および炎症性サイトカインの産生を抑制する
17:37 ○吉岡泰淳[1]，井上雅子[2]，古屋敷隆[3]，芦田　均[4]（[1]神戸大院・科技イノベ，[2]神戸大・農，[3]江崎グリコ㈱，[4]神戸大院・農）

2B05p19　シトラスおよびオレンジペクチンの給餌が実験的大腸炎保護効果に及ぼす影響の比較解析
17:48 ○真野敏行[1]，石其慧太[2]，北口公司[3]，矢部富雄[3,4]（[1]岐阜大院・自然科技，[2]岐阜大院・連合農学，[3]岐阜大・応用生物，[4]生命の鎖統合研究センター）

2B05p20　インドールピルビン酸のマウス大腸炎症の抑制機構の検討
17:59 ○青木玲二[1]，青木綾子[2]，鈴木チセ[1]，高山喜晴[1]（[1]農研機構畜産研，[2]東大院農生科）

B06 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B06a01　培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるイソラムネチンの抗高尿酸血症作用の検討
9:00 ○安達真一[1]，高見有希[2]，近藤真司[1]，佐藤祐介[3]，吉澤史昭[3]，矢ヶ崎一三[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]宇都宮大院・農，[3]宇都宮大・学術院）

2B06a02　アブラナ科伝統野菜スプラウトの ACE 阻害物質の探索
9:11 ○根古谷竜，下村講一郎　（東洋大院生命）

2B06a03　チオレドキシン -1 高含有食による糖尿病モデルマウス血糖コントロールの改善
9:22 ○渡邉理江[1,2,3]，　蘆田弘樹[3]，　増谷　弘[2]，　三浦美樹子[2,4]，横田明穂[3]，淀井淳司[2,5]（[1]美作大学食物，[2]京都大学ウ研，[3]奈良先端科学技術大院バイオ，[4]島根大医，[5]Ewha女大細胞シグナル）

2B06a04　生理活性希少糖 D-アルロースの作用メカニズム：線虫における細胞内エネルギーレベルへの影響
9:33 ○石井綾佳[1]，太田侑里[1]，新谷知也[2]，佐藤正資[1]（[1]香川大農，[2]愛媛大院連合農）

2B06a05　希少糖 D-アルロースは食餌制限メカニズムによって線虫寿命を延長する
9:44 ○佐藤正資[1]，新谷知也[2]，砂古口博文[1]，吉原明秀[3]，何森　健[3]（[1]香川大農，[2]松谷化学工業，[3]香川大国際希少糖研究教育機構）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B06a06　UVA 反復照射により誘導された真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン産生低下におけるじゃがいも皮抽出物の改善効果
10:05 ○須藤麻里[1]，増冨裕文[1]，遠藤香凛[2]，石原克之[1]，正木　仁[2]（[1]カルビー㈱，[2]東京工科大）

2B06a07　ヒト皮膚繊維芽細胞のコラーゲン分解酵素に対する蜜花豆抽出物の作用
10:16 ○草川太郎[1]，　石田有希子[2]，　斉藤憲二[2]，　昆　良子[2]，Binti Jasni Nur Nadia[2]，坂下真耶[2]，内田良一[2]，金　武祚[2]（[1]㈱フューチャーラボ，[2]㈱ファーマフーズ）

2B06a08　ヒト真皮繊維芽細胞の IL-1*α* 刺激によるエラスターゼ発現に対する *Kaepferia parviflora* 抽出物の作用
10:27 ○小林桃佳[1]，渡辺章夫[2]，出口有佑[3]，遠藤ゆき[1]，稲垣恭平[1]，小塚隆造[3]，古澤明里[1]，米澤貴之[2]，禹　済泰[1]（[1]中部大応生，[2]中部大生機研，[3]中部大応生院）

2B06a09　*Lactobacillus gasseri* N320 株による皮膚機能改善効果
10:38 ○上原和也，砂田洋介，田中　充，松尾伸二，田辺創一，仲村太志　（日清食品ホールディングス㈱・グローバルイノベーション研究センター）

2B06a10　Anti-aging Effect and Its Mechanism of Plantase Treated Zizania latifolia Extract on Human Dermal Fibroblasts
10:49 ○Park Se-Ho[1]，Seun-Ah Yang[2]（[1]Department of Applied Chemistry, Kumoh national institute of technology, [2]Major in Food Science and Technology, Keimyung University）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B06a11　食品由来の抗酸化物質における分配係数，細胞生存能に関する比較検討
11:10 ○布田博敏[1]，上甲紗愛[1]，渡邉　貢[2]，武田晴治[1]，古川貴之[1]，Rojeet Shrestha[1]，惠　淑萍[1]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学　大学院保健科学研究院，[2]株式会社渡辺オイスター研究所）

2B06a12　ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究
11:21 ○丹羽利夫[1]，横山慎一郎[2]，望月美佳[3]，大澤俊彦[3]（[1]修文大健康栄養，[2]岐阜県産業技術セ，[3]愛知学院大心身科学）

2B06a13　野菜に含まれる抗酸化力の数値に関する関連性の考察
11:32 増水章季[1]，河野雅弘[2]，徳田尚美[1]，高橋宏樹[1]，久永真央[1]，○丹羽真清[1]（[1]デザイナーフーズ株式会社，[2]東京工業大學）

2B06a14　*Arachis hypogaea*（ラッカセイ）の葉抽出物の抗酸化活性とその抗酸化物質の主な成分
11:43 ○栗原　彩，滝口泰之　（千葉工大工）

2B06a15　果物に含まれるエポキシカロテノイド及びその酸変換物の抗酸化活性
11:54 ○下出早貴，宮田佳奈，荒木美智子，加来奈緒子，原田桃子，新藤一敏　（日女大・家政・食物）

B06 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B06p01　ヒト皮脂中のスクアレン酸化機構の解析および抗酸化物質によるスクアレン酸化抑制効果の評価
14:00 ○清水直紀[1]，伊藤隼哉[1]，加藤俊治[2]，永塚貴弘[1]，宮澤陽夫[1,3]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農，[2]東海大医，[3]東北大未来科学技術共同研究セ）

2B06p02　イオンモビリティーを活用した過酸化リン脂質の LC-MS/MS 立体異性体解析法
14:11 ○伊藤隼哉[1]，加藤俊治[2]，永塚貴弘[1]，宮澤陽夫[1,3]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農，[2]東海大医，[3]東北大未来科学技術共同研究セ）

2B06p03　醤油粕由来セラミドの吸収機構と皮膚機能改善作用
14:22 太田知志[1]，開　　忍[2]，宮鍋征克[2]，植木達朗[3]，真鍋祐樹[1]，○菅原達也[1]（[1]京大院農，[2]㈱ジェヌインR&D，[3]福岡県醤油醸造協同組合）

2B06p04　魚油含有脂肪強化食が老化による脂質吸収能に与える影響
14:33 ○山本和史，都築　毅　（東北大院・農）

2B06p05　溶解剤としてのターメリックオイルはセサミン・セサモリンのマウス脳内移行を向上させる
14:44 ○岩本和子[1]，松村晋一[2]，吉岡百合[2]，久後裕業[1]，橋本佳祐[1]，宮本智絵[1]，星野健斗[1]，財満信宏[1]，森山達哉[1]（[1]近畿大農，[2]稲畑香料）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B06p06　白米ペプチドに含まれる睡眠ホルモン合成酵素活性化因子
15:05 ○畑中唯史[1]，守谷智恵[2]，川上賀代子[2]，藤田明子[3]，川上晃司[3]，下田博司[4]，坪井誠二[2]（[1]岡山県生物科学研究所，[2]就実大薬，[3]株式会社サタケ，[4]オリザ油化株式会社）

2B06p07　Long-term administration of *Lactobacillus paracasei* K71 isolated from sake lees prevents cognitive decline in senescence-accelerated mouse prone-8, SAMP8
15:16　○Henry Marzo Corpuz[1], Shigeru Katayama[2], Takakazu MItani[2], Toshihiro Mihara[3], Takehisa Kumagai[3], Soichiro Nakamura[1,2]　([1]Interdiscip Grad. Sch. of Shinshu Univ., [2]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [3]Kameda Seika CO., Ltd.)

2B06p08　山ウドのアンチエイジング効果と神経変性疾患予防効果について
15:27　○川住亮之，春原天真，宮島まどか，名取貴光　(山梨学院大・健康栄養)

2B06p09　クロレラの投与は認知症モデルマウスにおける認知記憶障害及び神経変性の進行を緩和する
15:38　○中嶋裕也[1]，大澤郁朗[2]，管野敏博[1]，太田成男[3]　([1]クロレラ工業株式会社，[2]東京都健康長寿医療センター研・生体環境応答，[3]順天堂大学大学院・神経学)

2B06p10　老化促進モデルマウス(SAM)の学習力と獲得記憶のストレス誘導性減衰はカキ熱水抽出物の経口摂取により抑制される－食品と記憶に関する研究　IV －
15:49　○松田　桂[1], 木屋佳奈恵[1], 香林美紅[1], 網野友香[1], 松田芳和[2], 河村幸雄[1]　([1]京都女子大学・院，[2]日本クリニック株式会社)

p11～p15 発表者の接続時間 16:00～16:10

2B06p11　廃糖蜜の DPPH ラジカル補足能の測定と XAD 樹脂による抗酸化物質の精製
16:10　○滝口泰之，古賀美里，山口達明　(千葉工大工)

2B06p12　アミロイド β 誘導性神経細胞死に対するシアニジン-3-グルコシドの抑制効果
16:21　○石橋実学[1]，池田　彩[2]，原　　崇[2]，池内　健[3]，中村澄子[4]，城斗志夫[2]，西澤正豊[3]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[4]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命，[5]越後製菓)

2B06p13　チョウザメおよびその含有成分の機能性
16:32　○神力はるな[1]，　永瀞清子[1]，　服部秀美[1]，　黒木勝久[1]，築地加代子[2]，　水光正仁[1]，　榊原陽一[1]　([1]宮崎大学，[2]㈱宮崎活魚センター)

2B06p14　栽培方法の異なるサトイモの成分分析と新規機能性の探索
16:43　○山之内博紀[1]，南　雄二[2]，加治屋勝子[2]　([1]鹿児島大院農，[2]鹿児島大農)

2B06p15　コマツナの品種・部位別ルテイン含量と SPAD 値(葉緑素量)との関係
16:54　○石本太郎[1]，馬場　隆[2]，野田誠司[1]　([1]東京都立食技セ，[2]東京都農総研)

p16～p20 発表者の接続時間 17:05～17:15

2B06p16　発酵大豆イソフラボン素材の経口摂取による糖化ストレス抑制作用
17:15　○梅田周佑，平松直人，呉　暁紅，岡田利孝　(㈱東洋発酵)

2B06p17　発酵大豆イソフラボンの最終糖化産物(AGEs)生成に対する影響
17:26　○平松直人，梅田周佑，呉　暁紅，岡田利孝　(㈱東洋発酵)

2B06p18　Lactaldehyde 由来新奇メイラード反応後期段階生成物の同定
17:37　○藤本汐莉，村上庸人，三宅春奈，早瀬文孝，渡辺寛人　(明治大農)

2B06p19　ニホンナシ剪定枝抽出物のメラニン生成抑制作用と抗糖化作用
17:48　○北舘奏子[1]，高橋麻子[1]，櫻井　望[2]，須田邦裕[2]，滝田　潤[3]，大江靖雄[1]，　平井　静[1]，　江頭祐嘉合[1]　([1]千葉大院園芸，[2]かずさDNA研，[3]日東ベスト)

2B06p20　アルブミン-グリセルアルデヒド系を用いたフロロタンニン類の抗糖化活性の評価
17:59　○谷口凌佑[1,5]，　杉浦真悟[1,5]，　田中礼士[1,3,5]，　三宅英雄[1,3,5]，モリテツシ[2,3,5]，　植田充美[4,5]，　柴田敏行[1,3,5]　([1]三重大院生資，[2]東京農工大院工，[3]三重大海藻バイオ研，[4]京都大院農，[5]JST・CREST)

B07 会場　午前の部(9:00～11:43)

食品―食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

2B07a01　大豆全粒粉末からの大豆サポニン Bb の迅速精製法開発ならびに亜鉛トランスポーター ZIP4 誘導活性の検証
9:00　○高橋正和[1]，打田慶明[1]，野場翔太[1]，神戸大朋[2]，片野　肇[1]　([1]福井県大生物資源，[2]京大院生命)

2B07a02　固定化金属イオン親和力クロマトグラフィーにおけるカゼイン類の挙動
9:11　○鈴木雅博　(農研機構)

2B07a03　亜鉛欠乏が妊娠期母ラットおよび仔ラットの貧血指標に及ぼす影響
9:22　○佐藤采香[1]，後藤知子[2]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]　([1]東北大・院農，[2]宮城学院女子大・生活科学)

2B07a04　鉄欠乏がラット小腸の抗酸化システムに及ぼす影響
9:33　○小泉真綾，芋岡佑里奈，篠田粧子　(首都大院・人間健康科学研究科・栄養生化学)

2B07a05　体内鉄量の変化に応答する血液遺伝子の発現変化の解析
9:44　○亀井飛鳥[1]，篠崎文夏[1]，安岡顕人[1]，嶋田耕育[1]，荒井綜一[1,2]，阿部啓子[1,3]　([1]KISTEC，[2]東農大，[3]東大院農生科)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

2B07a06　New stable derivatives of the bifidogenic growth stimulator 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid
10:05　○Hiroshi KASAI, Yuya KAWASAKI, Kazuaki KAWAI (Univ Occup & Environ Health)

2B07a07　PQQ 誘導体化による寿命延長への影響
10:16　○池本一人[1]，笹倉寛之[2]，森　郁恵[2]　([1]三菱ガス化学，[2]名古屋大)

2B07a08　ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩(PQQ)の認知機能評価
10:27　○杉本　淳，池本一人　(三菱ガス化学)

2B07a09　赤血球と癌細胞におけるビタミン C 酸化体の細胞への取り込みの評価
10:38　○宮澤大樹，松元　亮，合田達郎，宮原裕二　(東京医科歯科大学)

2B07a10　葉酸受容体 FOLR3 の機能解析
10:49　○中山　魁，藤村由紀，立花宏文　(九大院農院・生機科)

a11～a13 発表者の接続時間 11:00～11:10

2B07a11　ビタミン E を多く含む多収性飼料用米品種「オオナリ」を給与した豚肉の特性評価
11:10　○木村俊之[1]，中島郁世[2]，山口弘道[3]，草佳那子[3]，斎藤真二[4]，八日市屋敏之[4]，佐々木啓介[2]，小堀真珠子[1]，宮澤陽夫[5]，仲川清隆[5]　([1]農研機構食品研究部門，[2]農研機構畜産研究部門，[3]農研機構中央農業研究センター，[4]株式会社フリーデン，[5]東北大学大学院農学研究科)

2B07a12　線虫のカルボニル化合物レベルに及ぼすビタミン B_{12} 欠乏の影響
11:21　○藪田行哲，吉田佳代子，美藤友博，渡邉文雄　(鳥取大学農)

2B07a13　ビタミン B_{12} 欠乏が線虫(*Caenorhabditis elegans*)の生殖及び産卵機能に及ぼす影響
11:32　○美藤友博，岡本奈穂，森脇　涼，北村有子，藪田行哲，河野　強，渡邉文雄　(鳥取大農)

B07 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B07p01　日本食はマウスにおいてストレス軽減効果を有する：メタボローム解析による新しい生理効果の探索
14:00 ○都築　毅，巫　啓明，鄂　　爽，山本和史　（東北大院農）

2B07p02　腸内細菌脂質代謝物（修飾脂肪酸）を用いて見出された，CCK 分泌を強く促進する脂肪酸の特異的構造
14:11 ○小笠原奨之[1]，　矢萩明日香[1]，　比良　徹[1]，　西村紗希[2]，山下貴稔[2]，原　　博[1]　（[1]北海道大院・農，[2]株式会社 J-オイルミルズ 基盤研究所）

2B07p03　ダイゼイン腸内細菌代謝物エコールの雌特異的食欲低下効果の機構解明-雌雄ラットの腸肝循環エコール抱合代謝の比較-
14:22 ○藤谷美菜，阿部恭大，小林拓広，吉良真結，岸田太郎　（愛媛大院農）

2B07p04　腸―脳連関により抗うつ様作用を示す大豆ペプチド soy-deprestatin の作用機構
14:33 ○朝倉佐保，中戸絢也，森　薫葉，金本龍平，大日向耕作（京大院・農・食品生物）

2B07p05　牛乳由来ペプチドは高脂肪食摂取に伴う認知機能低下を改善する
14:44 ○永井研迅[1]，水重貴文[2]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]　（[1]京大院・農・食品生物，[2]宇都宮大・農・応用生命）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B07p06　無タンパク質食飼育マウスと老齢マウスに共通するグレリン感受性低下と視床下部遺伝子発現変化
15:05 ○竹隈幸洋，井口　慎，中戸絢也，金本龍平，大日向耕作（京大院農食品生物）

2B07p07　α-シヌクレイン過剰発現酵母株を用いた神経変性疾患に有効な物質の探索
15:16 ○井上奈々[1]，渡辺大輔[2]，上杉祥太[1]，大野美紗[1]，高木博史[2]，木村賢一[1]　（[1]岩手大学農学部，[2]奈良先端科学技術大学院大学）

2B07p08　焙煎度の異なる棒ほうじ茶の香気が脳機能に与える影響
15:27 ○小長井ちづる[1]，　藤原美佐子[2]，　笹木哲也[3]，　丸谷誠慶[4]，道畠俊英[3]　（[1]十文字学園女大・健康栄養，[2]㈱クレッシー，[3]石川県工業試験場・化学食品部，[4]㈱丸八製茶場）

2B07p09　消化管による cinnamtannin A2 の認識機構の探索
15:38 ○羽里直幹[1]，黒木麻由[1]，難波文男[2]，戸田登志也[2]，安達貴弘[3]，越阪部奈緒美[1]　（[1]芝工大 生命，　[2]フジッコ株式会社，　[3]東京医科歯科大）

2B07p10　エネルギー代謝改善を介したロスマリン酸の認知機能低下に対する効果
15:49 ○山下　玲[1]，長谷知輝[1]，浜口　毅[2]，篠原もえ子[2]，山田正仁[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]金沢大院・医・医，[3]神奈川県立産業技術総合研究所）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B07p11　ロスマリン酸による脳内モノアミン類変動の解析
16:10 ○長谷知輝[1]，山下　玲[1]，宍戸　駿[1]，豊田　集[2]，平　　修[3]，浜口　毅[4]，篠原もえ子[4]，山田正仁[4]，阿部啓子[1,2]，小林彰子[1]　（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川県立産業技術総合研究所，[3]福井県大・生物資源，[4]金沢大医）

2B07p12　ロスマリン酸の抗アルツハイマー作用に関する検証
16:21 ○山本　宗[1]，篠原もえ子[2]，浜口　毅[2]，山田正仁[2]，小林彰子[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]金沢大院・医・医）

2B07p13　国産ブドウ果皮抽出成分の神経保護作用を介した学習記憶改善効果の検証
16:32 ○岩田健吾[1]，佐々木一憲[2,3]，腰山雅巳[4]，礒田博子[1,2]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]産総研・触媒化学融合研究セ，[3]筑波大院・数理物質，[4]日本ゼオン㈱）

2B07p14　メタボリックプロファイリング解析による 緑茶品種サンルージュの認知機能低下抑制作用に関与する成分の同定
16:43 ○北村　稜[1]，野中遥奈[1]，佐藤由佳[1]，和才昌史[1,2]，村田　希[1]，藤村由紀[1]，立花宏文[1]　（[1]九大院農院・生機科，[2]日本製紙㈱）

2B07p15　鶏肉イミダゾールジペプチド摂取によるアルツハイマー病予防の可能性
16:54 ○舛岡伸高[1,2]，良峰千歳[1]，堀真理恵[1]，朝田　隆[3]，久恒辰博[1]（[1]東京大学新領域，[2]手賀沼病院，[3]メモリークリニック御茶ノ水）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B07p16　脳内セリン充足度の低下が脳高次機能障害を惹起する分子機序
17:15 ○濱野桃子[1,2]，　佐藤和貴[3]，　河野　唯[2]，　原口祐里奈[2]，立川正憲[3]，古屋茂樹[2,4]　（[1]福岡女子大，[2]九大院生物資源，[3]東北大院薬，[4]九大バイオアーキ）

2B07p17　微細藻類由来スクアレンの神経保護作用を介した空間学習記憶改善効果の解明
17:26 ○酒井宏子[1]，　佐々木一憲[2,3]，　吉田昌樹[1,4]，　出村幹英[1,4]，渡邉　信[1,4]，礒田博子[1,2]　（[1]筑大院・生命環境，[2]産総研・触媒化学融合研究セ，[3]筑波大院・数理物質，[4]筑大・藻類バイオマスセ）

2B07p18　フェルラ酸のエネルギー代謝促進作用を介した抗うつ様効果
17:37 ○岩田　望[1]，佐々木一憲[2,3]，礒田博子[1,2]　（[1]筑波大生命環境系，[2]産総研・触媒化学融合研究セ，[3]筑波大院・数理物質）

2B07p19　唾液分泌促進作用および塩味後味を示す pellitorine の構造活性相関
17:48 ○奥　直也，森岡静香，岩崎春香，五十嵐康弘　（富山県大工・生工セ）

2B07p20　クラス B スカベンジャー受容体 I に対するリガンド結合評価のための in vitro アッセイ系の確立
17:59 ○木本悠作[1]，都築　巧[2]，井上和生[2]　（[1]京大農，[2]京大院農）

B08 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 - 糖質，脂質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B08a01　麹甘酒の糖化工程改変による含有オリゴ糖増量の試み
9:00 ○小黒芳史，中村彩奈，倉橋　敦　（八海醸造・研究開発）

2B08a02　富有柿由来ペクチンの多糖構造の分析
9:11 ○後藤咲季[1]，高山和江[2]，北口公司[3,4]，矢部富雄[3,4]　（[1]岐阜大院・応生科，[2]一丸ファルコス，[3]岐阜大・応生，[4]生命の鎖統合研究センター）

2B08a03　大豆発酵食品中オリゴ糖の腸管膜における生理作用および定量分析
9:22 ○石川千秋，森光康次郎　（お茶大院ライフ）

2B08a04　セルロースナノファイバー経口摂取による消化管内環境の変遷
9:33 ○谷　史人[1]，　中山裕介[1]，　山野上実希[1]，　森島美千代[1]，桝田哲也[1]，　塚原隆充[2]，　井上　亮[3]，　小川剛伸[1]　（[1]京都大院農・食品生物，[2]栄養・病理学研究所，[3]京都府立大・生命環境）

2B08a05　キクイモ由来イヌリンのプレバイオティクス効果
9:44 ○森田　朗[1]，原　　崇[2]，城斗志夫[2]　（[1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B08a06　小麦品種間におけるデンプン特性と製麺性との関係
10:05 ○牧野萌弥[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[2]，高野克己[3]　（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加セ，[3]東京農大応生・化学）

2B08a07　発酵小麦デンプン粒の表層脂質が同デンプンの糊化およびゲル化特性に与える影響
10:16 ○羽賀大海[1]，野口治子[2]，高野克己[2]　（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

2B08a08　せん断力を加えた米ピューレの物性と澱粉分子構造の解析
10:27　新田陽佳[1]，長谷部満[1]，保坂優子[2]，涌井　徹[1]，○藤田直子[2]
([1]大潟村あきたこまち生産者協会，[2]秋田県立大生物資源)

2B08a09　ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性
10:38　○上沢七海[1]，星野優人[1]，伊藤　博[1]，小林厚志[1,2]　([1]日大工，[2]日大工・工学研究所・生物境界面の機能工学プロジェクト)

2B08a10　ジャポニカ米の脂肪酸組成と糊化特性，ヨード呈色多波長走査分析との関係
10:49　○中村澄子[1]，桂　順二[2]，丸山恭弘[2]，大坪研一[1]　([1]新潟薬大，[2]エヌエスピー)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B08a11　チャノキ脂質中の α-リノレン酸
11:10　○植田香織，齋藤洋昭　(石川県立大生物資源環境)

2B08a12　トコトリエノール及びトコフェロールの逆相 HPLC 法による一斉分析
11:21　○赤坂和昭　(尚絅学院大)

2B08a13　カサガイ類の生殖細胞から見いだされた末端二重結合を有する新規ジエン酸群の分布
11:32　○川島英城　(岩手県立大学宮古短大部)

2B08a14　タイワンシジミ抽出物に含まれる新規セラミドの探索
11:43　○山田耕史[1]，千々松武司[2]，梅木美樹[3,4]，小田裕昭[5]，望月　聡[4]
([1]長崎大院・医歯薬，[2]佐々木食品工業㈱自然食研，[3]別府大・食物栄養，[4]大分大・教育，[5]名大院・生命農)

2B08a15　サンゴ礁に生息する貝類脂質：ヤコウガイ等の脂質比較
11:54　○齋藤洋昭[1]，久保弘文[2]，玉城泉也[3]　([1]石川県立大学，[2]沖縄県水産海洋技術センター，[3]水産研究・教育機構)

B08 会場　午後の部(14:00〜18:10)

食品―食品化学 - 糖質，脂質/食品化学 - その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B08p01　潰瘍性大腸炎モデルマウスにおけるタモギダケの脂溶性画分の効果
14:00　○木下幹朗[1]，赤田康太[1]，猪部美穂[1]，山下慎司[1]，松本　聡[2]
([1]帯広畜産大学，[2]エル・エス コーポレーション)

2B08p02　腸管モデル細胞への炎症性刺激に対する スフィンゴ脂質ならびタモギダケ脂溶性画分の影響
14:11　○清野拓哉[1]，山下慎司[1]，松本　聡[2]，木下幹朗[1]　([1]帯広畜産大畜産，[2]エル・エスコーポレーション)

2B08p03　異なる炊飯ジャーで炊いた米飯に含まれる低分子化合物量の差異について
14:22　○辻井良政，髙野克巳　(東京農大応生・化学)

2B08p04　日本産，中国産のジャポニカ米の食味の理化学評価
14:33　○大坪研一[1]，中村澄子[1]，稲川　拓[1]，露木恵介[1]，川上知輝[1]，孫　雅君[2]，河野元信[3]　([1]新潟薬大，[2]中国北方稲作科学協会，[3]㈱サタケ)

2B08p05　コシヒカリの第 3 染色体短腕の良食味 QTL が登熟段階に及ぼす影響について
14:44　○木村圭一[1]，辻井良政[2]，齋藤彰宏[2]，堀　清純[3]，高野克己[2]
([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]農研機構作物開発セ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B08p06　高脂質ゲルにおけるゲル化剤の効果
15:05　○中島聡史，松本拓矩，秋山亜希子，増田麻衣，渡邉裕一，上田佳宏　(ソマール株式会社)

2B08p07　高脂質ゲル物性の検討
15:16　○松本拓矩，中島聡史，秋山亜希子，増田麻衣，渡邉裕一，上田佳宏　(ソマール株式会社)

2B08p08　アニオン界面活性剤を用いた卵黄汚れの除去機構解明
15:27　○横山　実[1]，鈴木政宏[1]，真砂賢次[2]，鈴木不律[1]，西澤伸広[1]
([1]花王株式会社　ハウスホールド研究所，[2]花王株式会社　解析科学研究所)

2B08p09　ナス果実に含まれるコリンエステルと含量
15:38　○松本健督[1]，和具なおみ[2]，鈴木美穂[1]，鈴木綾子[1]，宮武浩二[3]，高橋昭彦[4]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]信州大農・技術補佐員，[3]農研機構，[4]高知県農業技術センター)

2B08p10　コリアンダー(*Coriandrum sativum* L.)葉茎部における抗酸化活性を指標とした含有成分の解明
15:49　○小原理加[1]，恩田浩幸[2]，佐川岳人[2]，菊崎泰枝[3]　([1]奈良女子大院・食物栄養，[2]エスビー食品㈱，[3]奈良女子大・生活環境・食物栄養)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B08p11　味噌中の腸内炎症性物質(LPS)消去作用について
16:10　○金内　誠，山内　唯，石子彩夏　(宮城大　食産)

2B08p12　阿波晩茶の発酵過程において pH およびポリフェノールが微生物の生育に及ぼす影響
16:21　○小山翔大[1]，大渕明日香[2]，内野昌孝[2,3]，高野克己[2]　([1]東京農大院農化，[2]東京農大応生，[3]東京農大生命)

2B08p13　考古化学的視座による食品とその炭化物の化学分析
16:32　○大道公秀[1]，橘田　規[2]，奥脇早紀[1]，種あやめ[1]，西念幸江[1]，椎野　博[3]，清水文雄[3]，三舟隆之[1]　([1]東京医療保健大学，[2]日本食品検査，[3]アワーズテック)

2B08p14　LC-MS/MS による高感度マイコトキシン一斉分析手法の開発
16:43　○井本英志[1]，望月直樹[2]，渡辺　淳[1]　([1]島津製作所，[2]横浜薬科大学)

2B08p15　LC-MS を用いた穀物中のトリコテセン系カビ毒の一斉分析
16:54　○佐野勇気[1]，高橋洋武[1]，橘田　規[1]，佐藤信彦[1]，照井善光[1]，望月直樹[2]　([1]日本食品検査，[2]横浜薬科大学)

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B08p16　補糖及び補酸によるワイン中の水の酸素安定同位体比への影響
17:15　○赤松史一，清水秀明，鎌田　綾，藤井　力，後藤奈美　(酒類総研)

2B08p17　微生物による食品由来メイラード反応生成物の分解およびその作用機構の解析
17:26　○田野孝一，油井拓哉，島村裕子，増田修一，大橋典男　(静岡県立大学)

2B08p18　原料大麦の違いが麦茶品質に及ぼす影響
17:37　○神山紀子，金子成延，青木恵美子，柳澤貴司　(農研機構・作物開発センター)

2B08p19　新規開発酒米「栃木酒 27 号」の栽培条件の検討と醸造特性の解析
17:48　○矢澤　彌[1]，高橋正之[1]，小林拓嗣[1]，伊澤由行[2]，竹内菜央子[2]，菅谷和音[2]，粂川晃伸[2]，杉本琢真[3]，岩下和裕[1]　([1]酒総研，[2]栃木県農試，[3]兵庫県農総セ)

2B08p20　ブドウ果実由来のフェノール性化合物が食品加工用酵素剤中の Polygalacturonase (PGase) 活性に及ぼす影響 (第 2 報)
17:59　○堀西朝子，児玉祥基，尾﨑嘉彦　(近畿大学生物理工)

B09 会場　午後の部(14:00〜17:48)

食品―食品化学 - 色素，香料―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B09p01　クロロフィルの光退色に及ぼす凝集体形成の影響
14:00　○安田みどり[1]，田端正明[2]，豆野博一[1]，梶原健太[1]　([1]西九大健栄，[2]佐賀大理工)

2B09p02　酵母由来の核酸成分によるアントシアニンの色調への影響と相互作用
14:11　○後藤七美[1]，野口治子[2]，佐藤寿哉[3]，内村信宏[3]，山下裕隆[3]，津久井亜紀夫[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院農化，[2]東京農大応生，[3]興人ライフサイエンス㈱)

2B09p03　DAS™（Drinking Aroma Simulator）とリアルタイム質量分析計を用いたレモン飲料のフレーバーリリース分析
14:22　○安永元樹，葛西賢造，服部祥治，高垣仁志　(曽田香料株式会社)

2B09p04　R-FISS® による飲料香気成分のフレーバーリリース特性評価法
14:33　○糸部尊郁，樋口可南子，松田知子，熊沢賢二　(小川香料株式会社)

2B09p05　チョコレートにおけるキー成分の探索と評価
14:44　○海江田兼次　(株式会社明治)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B09p06　キシロース存在下でタンパク質の酸加水分解により形成される新規メイラード色素について
15:05　○野田響子，増崎瑠里子，寺内優花，村田容常　(お茶大食物)

2B09p07　メイラード反応モデル系におけるチアミン由来の黄色物質の形成
15:16　○井越明日香，野田響子，村田容常　(お茶大食物)

2B09p08　キシロース－リジン系メイラード反応の着色におけるジカルボニル化合物や 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン(HMFO)の役割
15:27　○中村美月，村田容常　(お茶大食物)

2B09p09　チーズフレーバー素材を添加した飲食品のリアルタイム香気分析によるレトロネーザルアロマ評価
15:38　○西川　卓，安永元樹，青山武史，佐野恵右　(曽田香料㈱)

2B09p10　ほうじ茶中の新規重要香気成分の同定
15:49　○稲永俊介，伊藤麻紀子，宮澤　和，吉川啓輔，石崎　亨　(長谷川香料株式会社 総合研究所)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B09p11　小麦ストリーム粉の揮発性成分に影響する酵素活性
16:10　○成澤朋之[1,2]，海野まりえ[1]，仲島日出男[1]，小島登貴子[1]，乙部千雅子[3]，金子成延[3]，杉山健二郎[4]，朝倉富子[2]，山田昌治[4]　([1]埼玉産技セ北部，[2]東大院農，[3](国研)農研機構・作物開発センター，[4]工学院大先進工)

2B09p12　超高速 GC とにおい嗅ぎ GCMS を用いた各種抗酸化物のリノール酸由来酸化臭抑制挙動の解析
16:21　○太田香穂，菊池佑美佳，南　育子，小林弘司，石川洋哉　(福岡女子大学)

2B09p13　ダージリンのマスカット香に寄与する成分の同定
16:32　○福井康大，原口賢治，大森雄一郎，小西俊介，中西　啓，吉川啓輔，石崎　享　(長谷川香料株式会社　総合研究所)

2B09p14　湘南ゴールドみかん果皮の特徴香気成分と冷凍時の変化について
16:43　○渡辺桃子，磯崎理奈，尾島光広，大槻　崇，松藤　寛　(日大生資科)

2B09p15　亜臨界水を用いた薄荷抽出液の特性分析
16:54　○野村詩織[1]，邱　泰瑛[1]，渡邊大吾[1]，永田裕一[2,3]，齋藤　徹[1]　([1]北見工大，[2]北見ハッカ通商，[3]北見ハッカ研究所)

p16〜p18 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B09p16　シソふりかけの香気特性に関する研究
17:15　○谷澤　純，勝野那嘉子，西津貴久　(岐阜大学)

2B09p17　Study of aroma development characteristic of Yudane bread
17:26　○Minghong YANG，Nakako KATSUNO，Takahisa NISHIZU　(Gifu University)

2B09p18　高原山椒の香気特性に関する研究
17:37　○堀部萌希，勝野那嘉子，西津貴久　(岐阜大学)

B10 会場　午前の部(9:00〜11:43)

食品―食品工学 - 保蔵，安全性―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B10a01　鶏卵の食中毒防止を目的とした鮮度測定法の検討 1(ハウユニットと卵黄係数の比較)
9:00　○久保七彩[1]，山下真由子[1]，中上ひかる[2]，八田　一[1]　([1]京女大院家政，[2]京女大家政)

2B10a02　鶏卵の食中毒防止を目的とした鮮度測定法の検討 2（卵黄係数とサルモネラ菌の増殖性の関係）
9:11　○山下真由子[1]，久保七彩[1]，岡真優子[2]，上野義栄[3]，八田　一[1]　([1]京女大院家政，[2]京都府立大院，[3]京都府中小企業技術センター)

2B10a03　食品中から分離された低温生育性セレウスグループの解析
9:22　○外川理絵[1]，田島洋介[1,2]，大谷重徳[1,3]，小泉大輔[1]，岩崎卓己[4]，川崎浩子[4]，庵原啓司[1]　([1]マルハニチロ㈱，[2]日本適合性認定協会，[3]ニチロ畜産㈱，[4]製品評価技術基盤機構)

2B10a04　食中毒原因菌であるセレウス菌(*Bacillus cereus*)の迅速かつ精密な識別法の開発
9:33　○川崎浩子[1]，下平　潤[1]，上條知昭[1]，田島洋介[2,3]，大谷重徳[2,4]，庵原啓司[2]　([1]製品評価技術基盤機構，[2]マルハニチロ㈱，[3]日本適合性認定協会，[4]ニチロ畜産㈱)

2B10a05　ラオス淡水魚発酵調味料におけるヒスタミン発生の特性および産生菌の分離
9:44　○丸井淳一朗[1]，羽佐田勝美[1]，イエタオギアバン[2]，スパチャイプパスック[2]，サイビセンブロム[2]　([1]国際農研，[2]ラオス大農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B10a06　カリン(*Pseudocydonia sinensis*)の抗ノロウイルス効果
10:05　○詹　佳樺[1]，神本真紀[1,2]，藤阪幸恵[1]，岩野弘嗣[1]，島本　敏[1]，成谷宏文[1]，　島本　整[1]　([1]広島大・院・生物圏科学・食品衛生，[2](独)酒類総研)

2B10a07　低 pH におけるコーヒーの殺菌作用について
10:16　○上野寛子，筒浦さとみ，村田容常　(お茶大食物)

2B10a08　大気圧プラズマによるバジルの殺菌と香気成分評価
10:27　○森田祐介[1]，武村祐一朗[1]，古田雅一[2]，藤山貴友[2]　([1]近大院総理工，[2]大阪府大工)

2B10a09　可溶性の食品添加物粒子による腸内細菌叢の構造変化
10:38　新居靖崇，下田　舞，○徳本勇人　(阪府大)

2B10a10　細胞固定化センサチップを用いた Surface Plasmon Resonance（SPR）センサによる細胞毒性評価法の開発
10:49　○小林弘司，中原　萌，緒方千晶，山内良子，石川洋哉　(福岡女子大・国際文理)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B10a11　玄米の励起蛍光マトリクスと脂質劣化との関係
11:10　○石垣貴大[1]，田原裕介[2]，高津地志[3]，藤田明子[3]，渡邉義之[2]，野村正人[2]　([1]近畿大院システム工，[2]近畿大工，[3]㈱サタケ)

2B10a12　脂質ハイドロゾルの安定性に及ぼす流動特性の影響
11:21　○品田将史[1]，國分慶有[2]，渡邉義之[2]，澤邊昭義[3]，菅野憲一[4]，野村正人[2]　([1]近畿大院システム工，[2]近畿大工，[3]近畿大農，[4]近畿大産業理工)

2B10a13　貯蔵条件の異なるリンゴ‘ふじ’における褐変の発生とその揮発性バイオマーカーの検索
11:32　○田中福代[1]，立木美保[2]，松原和也[3]，岡崎圭毅[1]，葛西　智[4]　([1]農研機構中央農研，[2]農研機構果樹茶部門，[3]立命館大，[4]青森産技セりんご研)

B10 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―食品工学 - 物性，分析―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B10p01　γCyclodextrin と Forchlorfenuron の固体分散体による物性評価
14:00 ○平野　愛，恵沢敏成，鈴木莉奈，村田　勇，井上　裕，古旗賢二，金本郁男　（城西大薬）

2B10p02　γ-シクロデキストリンを用いた還元型コエンザイム Q10 包接複合体の調製
14:11 ○上梶友記子，寺尾啓二　（シクロケムバイオ）

2B10p03　超臨界二酸化炭素抽出法を用いたクレソンに含まれる機能性成分の分析
14:22 ○中屋　慎[1,2]，小谷口美也子[2]，庄條愛子[3]，水野淨子[3]，北村進一[1]　([1]大阪府立大学，[2](有)IPE，[3]相愛大学)

2B10p04　ヘルムホルツ共鳴を用いたビール泡の品質評価に関する研究
14:33 ○上田裕紀[1]，西津貴久[1]，勝野那嘉子[1]，磯江　晃[2]，畑中一成[2]　([1]岐阜大学，[2]サントリービール株式会社)

2B10p05　Determination of apparent Tg characterized by flavor release from emulsified flavor powders and yeast cells using aroma sensor
14:44 ○Afroza SULTANA[123]，Jian Long Zhu[1]，Hidefumi Yoshii[1,2]　([1]Kagawa Univ.，[2]UGAS, Ehime Univ.，[3]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B10p06　1 級溶媒と分取セルを利用した HPLC-UV 分析・分取
15:05 ○松本恵実，中塚宏志，中塚進一　（長良サイエンス㈱）

2B10p07　近赤外スペクトルによるスティックコーヒー原料混合比率の迅速分析：水分含量の影響
15:16 ○阪口　宗[1]，石川　裕[1]，金谷克彦[1]，長谷川淳治[1]，山本信彦[2]，中村岳幸[2]，貝島健太[2]，萩原知明[1]　([1]海洋大海洋科，[2]東洋ハイテック)

2B10p08　分光学的手法を用いた固体食品表面の水分活性モニタリング
15:27 ○石川大太郎[1]，上野源次郎[2]，藤井智幸[1]　([1]東北大院農，[2]日本ハム㈱)

2B10p09　アセチルアセトン誘導体化法および GC-MS を用いた迅速かつ選択的な食肉・食鳥肉中の次亜臭素酸および次亜塩素酸定量法の検討
15:38 ○鈴木一平[1,2]，久保田浩樹[1]，建部千絵[1]，多田敦子[1]，佐藤恭子[1]　([1]国立医薬品食品衛生研究所，[2]国立研究開発法人　医薬基盤・健康・栄養研究所)

2B10p10　自己駆動型クーロメトリーを用いた過酸化水素の定量法の開発とその応用
15:49 ○三木功次郎，古辻ななみ，北村　誠，石丸裕士　（奈良高専）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B10p11　混合粉砕物による γCyclodextrin と Daidzein の物性評価
16:10 ○長田麻衣，鳴海祥恵，恵沢敏成，鈴木莉奈，村田　勇，井上　裕，古旗賢二，金本郁男　（城西大薬）

2B10p12　豆腐の処方がテクスチャーに及ぼす影響　〜生体計測による摂食嚥下特性の評価〜
16:21 ○加藤元裕[1]，櫻井英樹[1]，西垣壽人[1]，池田三知男[1]，堀　一浩[2]，小野高裕[2]　([1]森永乳業・研究本部，[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科)

2B10p13　米菓咀嚼中の食塊物性の変化が口どけ感に及ぼす影響
16:32 ○細井友加里[1]，山谷健太[2]，竹井　亮[2]，丸山健太郎[2]，勝野那嘉子[3]，西津貴久[3]　([1]岐阜大院，[2]亀田製菓株式会社，[3]岐阜大)

2B10p14　プロテアーゼ処理した米タンパク質を添加したグルテンフリー米粉バッターの動的粘弾性について
16:43 ○井上七海，有側紗愛，本多裕司　（石川県大・生資環）

2B10p15　高硬度ゲル形成乾燥卵白におけるタンパク質分子間の結合の様相について
16:54 ○根本裕子[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[3]，江崎智弘[4]，児玉里紗[4]，半田明弘[4]，野口智弘[2]，高野克己[3]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学，[4]キユーピー㈱研究開発本部)

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B10p16　人工知能は食感を予測できるか？ －麺内部の 3 次元ミクロ構造からの食感の予測－
17:15 ○小川剛伸，谷　史人　（京大院農）

2B10p17　ゲル状食品のレオロジー解析によるテクスチャー評価
17:26 ○鬼島直子[1]，砂押　諒[2]，石川大太郎[2]，藤井智幸[2]　([1]東北大未来研，[2]東北大院農)

2B10p18　食品の違いが嚥下筋活動時間に与える影響
17:37 ○中川晴貴[1]，澤野友貴[1]，渡辺誠一[1]，小木曽加奈[2]，大森信行[3]，百瀬英哉[4]　([1]長野高専，[2]長野県短大，[3]長野県工技センター，[4]スキノスNAGANO)

2B10p19　通電処理によるシカ肉の嗜好性
17:48 ○小木曽加奈[1]，川口友万[2]，中川晴貴[5]，大森信行[3]，百瀬英哉[4]，渡辺誠一[5]，澤野友貴[5]，古田一匡[6]，坂田亮一[7]　([1]長野県短大，[2]科学実験酒場，[3]長野県工業技術総合センター材料技術部門，[4]株式会社スキノスNAGANO，[5]長野高専，[6]富士通株式会社，[7]麻布大獣医)

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

A01 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A01a01　レシチンの給与が乳牛ルーメン発酵，乳生産に与える影響
9:00　○雑賀あずさ[1]，泉　賢一[2]，岸野重信[1]，井上　亮[3]，木村　功[4]，斎藤三四郎[4]，小川　順[1]　([1]京大院農，[2]酪農大，[3]京府大生環，[4]㈱J-オイルミルズ)

3A01a02　ミツバチ腸内細菌の遺伝子改変技術の開発
9:11　○福田洸平[1]，新谷政己[1]，宮崎　亮[2]　([1]静大創造，[2]産総研)

3A01a03　遅発育性病原菌の迅速薬剤感受性試験法の開発
9:22　○塚谷忠之[1]，末永　光[1]，池上　天[2]　([1]福岡県工技セ・生物食品研，[2]同仁化学研究所)

3A01a04　エマルションドロップレットを用いた微生物培養
9:33　○村井雄大，森田直樹，土居克実，久原　哲，田代康介，牟田　滋　(九州大　院農)

3A01a05　サントパイン分解能を有する根粒菌の探索とその特性評価
9:44　○島崎智久，元　　坤，岡崎　伸，藤井義晴　(東京農工大学・院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A01a06　高温性プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝におけるコハク酸脱水素酵素の生理的役割
10:05　○津島由佳[1]，石口貴之[3]，高坂智之[1,2]，山田　守[1,2]　([1]山口大院・創科，[2]山口大中高温微生物セ，[3]山口大院・農)

3A01a07　ビフィズス菌のアラビアガム資化性の鍵を握る酵素 endo-1,3-α-L-arabinofuranosidase の機能解析
10:16　○佐々木優紀[1]，堀米綾子[2]，小田巻俊孝[2]，清水(肖)金忠[2]，北原兼文[1]，藤田清貴[1]　([1]鹿児島大農，[2]森永乳業・基礎研)

3A01a08　*Bifidobacterium adolescentis* のアラビノガラクタン-プロテイン分解酵素群をコードする遺伝子クラスターの解析
10:27　○藤田清貴，嵩下愛果，東郷奈未，福元　諒，角町華子，佐々木優紀，北原兼文　(鹿児島大農)

3A01a09　ラットへのコール酸および難消化性オリゴ糖の同時投与による腸内細菌叢改変に基づいたデオキシコール酸生成菌と相互作用する腸内細菌種の探索
10:38　○佐竹実菜子[1]，吹谷　智[1]，佐藤昌直[1]，石塚　敏[1]，小椋義俊[2]，林　哲也[2]，横田　篤[1]　([1]北大院農，[2]九大院医)

3A01a10　マウス糞便からの酸素フリーラジカルの検出，定量ならびに腸内環境評価への活用
10:49　○脇田義久[1]，斎木朝子[1]，金田弘挙[1]，瀬川修一[1]，土屋陽一[1]，亀谷宏美[2]，　岡本　晋[2]　([1]サッポロホールディングス・価値創造フロンティア研究所，[2]農研機構・食品研究部門)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A01a11　発酵制御因子により集積される高耐性グリセリン分解菌の菌叢解析
11:10　○倉橋健介[1]，日髙光將[1]，徳本勇人[2]　([1]阪府大高専，[2]阪府大・理)

3A01a12　軽油分解メタン発酵微生物群集の群集構造解析
11:21　○原田智菜[1]，佃　玲奈[2]，稲葉桂子[1]，野村　泉[1]，上原　葵[1]，鈴木　徹[1,2]，中村浩平[1,2]　([1]岐阜大応生，[2]岐阜大院応生)

3A01a13　固体表面への付着現象に基づく複合微生物の分離技術の開発
11:32　○酒井智子，大西章博，藤本尚志，蒋　紅与　(東農大)

3A01a14　時空間的不均一環境において緑膿菌の進化動態を規定する適応形質と種間相互作用の寄与
11:43　○山本京祐[1,2]，草田裕之[2]，鎌形洋一[2]，玉木秀幸[1,2,3]　([1]筑波大生命環境，[2]産総研生物プロセス，[3]東大生セ)

3A01a15　*Kaistia* sp. 32K 株との共培養時における *Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上とバイオフィルム形成への影響
11:54　○薄井祥明[1]，若林　佑[1]，清水　哲[2]，中村　顕[2]，伊藤政博[1]　([1]東洋大院 生命科学，[2]筑波大 生命環境系)

A01 会場　午後の部(14:00〜14:55)

微生物―その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A01p01　食物アレルギーモデルマウスにおける OVA 発現乳酸菌経口投与の影響
14:00　○皆広嘉慧[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]　([1]東農大院農化，[2]東農大応生科)

3A01p02　排便時に発生するガス成分による腸内環境スクリーニング法の研究
14:11　渡辺瑞希[2]，○加藤　完[1]，中西裕美子[1]，新(田口)奈緒子[1]，伊藤鮎美[1]，池田麻衣[2]，木塚里子[2]，竹下朱美[2]，大野博司[1]　([1]理研統合生命，[2]TOTO)

3A01p03　ヒト皮膚常在細菌の相互作用に関する研究
14:22　○笹原榛華，島村裕子，増田修一，大橋典男　(静岡県立大学)

3A01p04　布製レンタルおしぼりから単離した Brevibacillus reuszeri NIT02 株のドラフトゲノム解析
14:33　○安楽飛伽[1]，佐野健一[1,2]　([1]日工大院環境共生，[2]日工大工)

3A01p05　分子生物学的手法を用いた空中浮遊菌の迅速検出法の確立
14:44　○徳田玲香，岩谷　駿，梶原　将　(東京工業大学)

A02 会場　午前の部(9:00〜11:54)

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖/細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A02a01　植物栽培における有機施肥と化学施肥土壌の細菌数及び細菌叢の変化
9:00　○原田　栞[1]，森谷政孝[1]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]　([1]立命大院生命，[2]立命大生命)

3A02a02　洗濯衣類のバクテリア叢と洗濯工程におけるバクテリア叢変動の解析
9:11　○野田浩史[1]，松村吉信[1,3]，井上貴晴[1]，冨岡敏一[1]，脇田克也[2]　([1]関西大・生命生物工，[2]パナソニック㈱，[3]関西大・ORDIST)

3A02a03　紀州なれずしの発酵過程における細菌叢の変遷とその要因
9:22　○土井遼平[1]，奥村真衣[2]，藤田知佳子[2]，水野洸介[2]，上原　葵[2]，野村　泉[1]，稲葉桂子[1]，島田昌也[1]，鈴木　徹[1]，早川享志[1]，中川智行[1]　([1]岐阜大院自然科学，[2]岐阜大応生)

3A02a04　伝統的純米壺造り黒酢醸造における熟成期の網羅的解析
9:33　○渡辺紳太[1]，青柳　智[2]，堀　知行[2]，藤井　暁[3]，長野正信[3]，亀谷将史[1]，新井博之[1]，石井正治[1]　([1]東大院農，[2]産総研　環境管理研究部門，[3]坂元醸造株式会社)

3A02a05　活性汚泥における微生物捕食作用の機構解明と捕食促進による汚泥減容効果
9:44　○佐藤由也，稲葉知大，堀　知行，羽部　浩　(産総研環境管理)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A02a06　土壌由来難培養性細菌の単離及び易培養性細菌との共存関係
10:05　○高橋紳八[1]，加藤広海[1]，永田裕二[1]，大塚重人[2]，大坪嘉行[1]，津田雅孝[1]　([1]東北大院生命，[2]東大院農生命)

3A02a07　環境汚染物質の分解細菌コミュニティにおける非分解菌コロニーの分解菌コロニーへの接近現象
10:16 ○加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二 （東北大院生命）

3A02a08　難分解性芳香族化合物分解コンソーシアム由来の分解細菌 *Mycobacteirum* sp. EPa45 株における生育阻害機構
10:27 ○小川なつみ，加藤広海，岸田康平，市橋永吉，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝 （東北大院生命）

3A02a09　サンゴから単離した共在微生物による病原菌の生育抑制機能評価
10:38 ○三浦夏子[1]，元根啓佑[1,2]，高木俊幸[2,3]，植田充美[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]東大大気海洋研）

3A02a10　サンゴ共生褐虫藻の単離・培養条件の検討
10:49 ○元根啓佑[1,2]，三浦夏子[1]，高木俊幸[2,3]，青木　航[1]，植田充美[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]日本学術振興会，[3]東大・大気海洋研）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A02a11　エレメンタル土壌微生物接種による非土壌媒体の土壌化
11:10 ○篠原　信[1]，吉田賢啓[2]，岡田若子[3]，宇佐美晶子[3]，サクンタラサイジャイ[3]，安藤晃規[3,4]，宮本憲二[5]，加藤康夫[6]，小川　順[3,4]，高野雅夫[2] （[1]農研機構，[2]名古屋大学，[3]京大院農・応用生命，[4]京大・生理化学，[5]慶大・理工，[6]富山県立大工・生工研セ）

3A02a12　高濃度の亜硝酸を酸化しうる硝化菌の単離と諸性質の解析
11:21 ○岡田若子[1]，安藤晃規[1,2]，宇佐美晶子[1]，Sakuntala Saijai[1]，宮本憲二[3]，加藤康夫[4]，篠原　信[5]，小川　順[1,2] （[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]慶大・理工，[4]富山県立大工・生工研セ，[5]農研機構）

3A02a13　Comparative study of nitrification-promoting factors in designed microbial consortia
11:32 ○Richard Metzner[1]，Naoki Kitaoka[1]，Taiji Nomura[1]，Kenji Miyamoto[2]，Makoto Shinohara[3]，Akinori Ando[4,5]，Jun Ogawa[4,5]，Yasuo Kato[1] （[1]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]NARO, [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.）

3A02a14　糸状菌と枯草菌の相互作用の解析
11:43 ○久知良桃花，尾花　望，野村暢彦，竹下典男 （筑波大生命環境）

A02 会場　午後の部（14:00〜15:16）

微生物―その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A02p01　電子線トモグラフィー法で観察した酢酸菌のセルロースリボン構造
14:00 ○中井朋則[1]，村田和義[2]，山内大輔[1]，峰雪芳宣[1] （[1]兵庫県大生命理，[2]生理学研究所）

3A02p02　アクチノロージンと結合する放線菌由来分泌タンパク質
14:11 ○西山辰也[1]，橋本義輝[2]，髙野英晃[1]，熊野匠人[2]，小林達彦[2]，上田賢志[1] （[1]日大生資科，[2]筑波大院・生命環境）

3A02p03　anammox 菌による外来ヒドラジンの代謝
14:22 ○西山　孝[1]，古川憲治[2]，藤井隆夫[1] （[1]崇城大・応生命，[2]熊大院・自然科学）

3A02p04　F 因子による R388 の接合伝達増強
14:33 ○恩田翔輝，横井崇紘，片岡正和 （信州大）

3A02p05　放線菌線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析
14:44 ○大橋沙季[1]，丸山直也[1]，池田治生[2]，片岡正和[1] （[1]信州大学，[2]北里大学）

p06 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A02p06　トキイロヒラタケの形質転換法の開発とその応用
15:05 ○福田泰久，魚川岳登，佐藤　魁，川野雄亮，清原昴輝，阿部美穂，白坂憲章 （近畿大農）

A03 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A03a01　新規 PKC 阻害剤 Z-705 の糸状菌特異性と既存 PKC 阻害剤との作用性比較解析
9:00 ○菅原亜寿美[1]，吉見　啓[2]，庄司郁央[1]，中山真由美[2]，藤岡智則[3]，河合　清[3]，萩原大祐[2,4]，片山琢也[5]，堀内裕之[5]，梅山秀明[6]，阿部敬悦[1,2] （[1]東北大院農・生物産業創成，[2]東北大・未来研，[3]クミアイ化学工業，[4]筑波大生命環境，[5]東大院農，[6]中央大理工）

3A03a02　Phenotypic variations indicate an *in vivo* evolution in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*
9:11 ○Cai BIAN[1]，Daisuke HAGIWARA[1,2]，Yoko KUSUYA[1]，Akira WATANABE[1]，Hiroki TAKAHASHI[1,3] （[1]MMRC, Chiba Univ., [2]Life Env. Sci., Tsukuba Univ., [3]MCRC, Chiba Univ.）

3A03a03　小胞体ストレス応答は麹菌のアミラーゼ生産に必要である
9:22 ○田中瑞己[1]，河原崎泰昌[1]，新谷尚弘[2]，五味勝也[2] （[1]静県大食栄，[2]東北大院農）

3A03a04　長期高濃度エタノールストレスによる酵母細胞骨格への影響：小型セプチンリングの形成誘導
9:33 穂本聖奈，○井澤真吾 （京都工繊大応生）

3A03a05　高濃度エタノールストレスによる変性タンパク質の蓄積と酵母 *BTN2* の発現誘導
9:44 ○白木千夏，加藤沙枝，井澤真吾 （京都工繊大応生）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A03a06　メタノールセンサー因子 PpWsc1 による CWI 経路依存的なペキソファジー抑制機構の解析
10:05 ○大澤　晋，阪井康能，由里本博也，奥　公秀 （京都大農）

3A03a07　酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導
10:16 ○吉川雄樹，那須野亮，高木博史 （奈良先端大　バイオ）

3A03a08　過剰なトリプトファンによる細胞毒性の解析
10:27 ○大橋一登 （群大・生調研）

3A03a09　出芽酵母のアクチン再極性化における Pkc1 による Rho GTPase 活性化因子 Rgd1 のリン酸化の関与
10:38 ○野村　亘[1,3]，二股良太[2]，後藤　剛[1,3]，河田照雄[1,3]，井上善晴[2] （[1]京大院・農・食品生物，[2]京大院・農・応生科，[3]京大・生理化学研究ユニット）

3A03a10　出芽酵母におけるナンセンス変異により形成される C 末端にポリ Q 配列を有する変異 Cyc8 のプリオン様の挙動
10:49 ○河井重幸[1]，村田幸作[2] （[1]京大院農，[2]摂南大理工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A03a11　Pib2 を介した TORC1 活性化機構の解析
11:10 ○谷川美頼，山本勝良，前田達哉 （東京大学分生研）

3A03a12　分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析
11:21 ○植田早紀[1]，水沼正樹[2]，久米一規[2] （[1]広島大・工，[2]広島大院・先端研）

3A03a13　Rst2 の高発現による細胞への影響
11:32 ○竹中航平，川向　誠，松尾安浩 （島根大生資）

3A03a14　分裂酵母セラミドリモデラーゼ Cwh43 は栄養源である窒素源とグルコースへの応答を調節し，中性脂肪の蓄積を抑える
11:43　○中沢宜彦[1], 照屋貴之[1], 佐二木健一[1], 熊田和貴[1], 新川織江[1], 髙田順子[1], 齋藤成昭[2], 柳田充弘[1]　([1]沖縄科学技術大学院大，[2]久留米大)

3A03a15　独立した二つのヘキソース感知機構を介した糖輸送体の発現制御：細胞外ヘキソース濃度モニター機構と細胞内解糖系速度モニター機構
11:54　○寺田祐子，副島朗子，齋藤成昭　(久留米大分生研)

A04 会場　午前の部(9:00〜11:54)

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A04a01　Possible role of L. paracasei BL23 sirtuin in cell division and/or cell shape regulation as indicated by intracellular localization and cell length analysis
9:00　○Glaezel Angelique Torres[1], Hotaka Atarashi[1], Takuya Gonda[1], Akinobu Kajikawa[2], Aiko Hirata[3], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1]　([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [3]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

3A04a02　*Lactobacillus paracasei* における脱アセチル化酵素サーチュインの機能解析
9:11　○新　穂高[1], トーレス-バレードグレイゼルアンジェリック[1], 権田拓弥[1], 梶川揚申[2], 川崎信治[3], 新村洋一[3], 遠藤明仁[1], 中川純一[1]　([1]東農大　生物産業, [2]東農大　応用生物科学, [3]東農大　生命科学)

3A04a03　*Lactobacillus paracasei* におけるサーチュインの標的タンパク質の解析
9:22　○権田拓弥[1], トーレス-バレードグレイゼルアンジェリック[1], 新　穂高[1], 伊藤昭博[2], 梶川揚申[3], 川崎信治[4], 新村洋一[4], 遠藤明仁[1], 中川純一[1]　([1]東農大　生物産業，[2]東京薬科　生命科学，[3]東農大　応用生物科学，[4]東農大　生命科学)

3A04a04　乳酸菌の磁化による経口ワクチンデリバリーシステムの開発
9:33　○佐藤　哲[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]　([1]東農大院農，[2]東農大応生科)

3A04a05　コリネ型細菌における ECF シグマ因子 σ^D の レギュロンの同定
9:44　○豊田晃一[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A04a06　毒性耐性に注目した芳香族化合物生産菌の適性解析
10:05　○小倉崚司[1,2]，久保田健[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

3A04a07　*Corynebacterium glutamicum* ストレス応答性遺伝子 uk3 の生物学的機能
10:16　○川内優輝，泉田正太郎，夏目　亮，川崎　寿　(東電大・院・工)

3A04a08　コリネ型細菌におけるコールドショックタンパク CspA の発現制御解析
10:27　○田中裕也[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

3A04a09　コリネ型細菌における RNase III の発現制御機構解析
10:38　○澤　誠人[1,2]，田中裕也[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

3A04a10　コリネ型細菌におけるアスパラギン及びアスパラギン酸の代謝関連遺伝子の機能解析
10:49　○土門晃大[1,2], 福井郁美[1,2], 須田雅子[2], 西村　拓[2], 豊田晃一[2], 平賀和三[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A04a11　ヒスチジンキナーゼセンサー EvgS の活性化に対する酸化還元状態の影響
11:10　○稲田慎也[1]，芦田　久[1,3]，内海龍太郎[2]，江口陽子[3]　([1]近畿大・院・生物理工，[2]近畿大・農，[3]近畿大・生物理工)

3A04a12　絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 存在下における生育停止機構に関する研究
11:21　○赤間拓海[1]，田島　怜[1]，鈴木裕之[1]，岡田拓也[1]，佐藤拓海[2]，新村洋一[1,2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

3A04a13　ビフィズス菌の O_2 高感受性に関与する原因酵素に関する研究
11:32　○宇野早織[1]，佐藤拓海[2]，河上千晴[1]，佐野寿広[1]，横尾有咲[1]，渡部拓也[1]，野村　泉[3]，加納康正[4]，鈴木　徹[3]，新村洋一[1,2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物，[3]岐阜大応生，[4]京薬大遺伝子工)

3A04a14　好気培養から嫌気培養への急激な転換は，酸素耐性菌 *Amphibacillus xylanus* 細胞内の遊離 Fe^{2+} を増加させる.
11:43　○大野由依[1]，木俣真弥[1]，有馬治人[1]，中川　遥[1]，中別府稜[1]，吉岡駿希[1]，石毛太一郎[2]，兼崎　友[2]，志波　優[3]，石川森夫[4]，藤田信之[3]，武田晃治[5]，吉村悦郎[6]，阿部　晃[7]，川崎信治[1]，新村洋一[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]東農大微生物，[4]東農大醸造，[5]東農大教職課程，[6]放送大教養，[7]札幌医大医学部眼科)

A05 会場　午前の部(9:00〜11:43)

微生物―遺伝子 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A05a01　スフィンゴモナス属細菌からの二価カチオンで駆動する新奇べん毛モーターの発見
9:00　○吉澤北斗[1], 長縄　俊[2], 伊藤政博[1,2]　([1]東洋大生命科学, [2]東洋大院生命科学)

3A05a02　好アルカリ性 *Bacillus trypoxylicola* がもつ Na^+，K^+ 駆動型 べん毛モーター固定子のイオン選択機構の解明
9:11　○長縄　俊，今澤　陸，伊藤政博　(東洋大院　生命科学)

3A05a03　好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株における細胞表層発現システムの構築及びその検証
9:22　○長澤朋世，伊藤政博　(東洋大学)

3A05a04　新規アラニン排出輸送体 YtfF の膜貫通領域内荷電アミノ酸の役割
9:33　○勝部　哲，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕　(東北大農)

3A05a05　枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾制御機構の解析
9:44　○近藤直子[1]，　鈴木祥太[1]，　吉田　稔[2,3]，　西山　真[1]，古園さおり[1,2]　([1]東大生物工学セ，[2]理研CSRS，[3]東大院農生科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A05a06　デアミナーゼと融合した新規デハロゲナーゼの特徴
10:05　○中鉢千尋，佐藤優花里，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大院生命科)

3A05a07　代謝酵素遺伝子群の人工クラスターを利用した有機塩素系殺虫剤資化細菌の育種
10:16　○蘇　立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二　(東北大学・大学院生命科学研究科)

3A05a08　ランダム変異による超好熱菌の低温適応関連遺伝子の探索
10:27　○大泉　翠[1]，二石涼平[1]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，今中忠行[2]，福居俊昭[1]　([1]東工大院・生命理工，[2]立命館大・生命科学)

3A05a09　冬虫夏草サナギタケ(*Cordysceps millitaris*)の各交配型における比較ゲノム解析
10:38　○鈴木智大[1], 鈴木貴也[2], 崔　宰熏[3,4], 小野晶子[1], 河岸洋和[3,4], 道羅英夫[2,4]　([1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・理，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研)

3A05a10　冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンが宿主への感染に及ぼす影響の検討
10:49　○小野晶子[1]，柏　　毅[2]，本山高幸[2]，崔　宰熏[3,4]，平井浩文[3]，道羅英夫[3]，長田裕之[2]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[5]　([1]宇都宮大・農，[2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[3]静岡大・グリーン研，[4]静岡大・農，[5]宇都宮大・バイオ)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A05a11　スギヒラタケに特異な化合物（pleurocybellaziridine）の生合成経路に関する化学的研究
11:10　○手塚裕紀[1]，　安重伸太郎[2]，　大庭　亨[2]，　崔　宰熏[3,4]，二瓶賢一[1]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[1,5]　([1]宇都宮大・農，[2]宇都宮大・工，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研，[5]宇都宮大・バイオ)

3A05a12　マコモタケの共存・不稔の分子機構解明
11:21　○丸田　瞳[1]，謝　肖男[2]，崔　宰熏[3,4]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[2]　([1]宇都宮大・農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研)

3A05a13　*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* G50 株の細胞表層タンパク質の解析
11:32　○鈴木チセ[1]，中川博之[2]，山崎俊正[2]，守谷直子[1]，木元広実[1]　([1]農研機構・畜産部門，[2]農研機構・高度解析セ)

A06 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム/遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A06a01　逆転写酵素の tailing 活性と新規 TSLR 反応を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析
9:00　○大坪嘉行，佐々木春菜，永田裕二，津田雅孝　（東北大学）

3A06a02　トランスクリプトーム解析を用いた環境細菌 *Burkholderia multivorans* の土壌環境適応戦略の解明
9:11　○田上　諒，西山依里，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝　（東北大院生命）

3A06a03　シアノバチルスにおけるシアノバクテリア遺伝子大規模発現の試み
9:22　○美田知也[1]，細村匡太郎[1]，渡辺　智[1]，兼崎　友[2]，板谷光泰[3]，朝井　計[1]，吉川博文[1]　([1]東京農大院バイオ，[2]東京農大ゲノム解析セ，[3]慶応大先端生命研)

3A06a04　リター層土壌 DNA からの未知セルラーゼ遺伝子の探索
9:33　○織田康太郎，藤井克彦　（山口大創成）

3A06a05　孤立飼育条件がマウスの脳及びその他臓器のトランスクリプトームに与える影響
9:44　○嶋田耕育[1]，安岡顕人[1]，亀井飛鳥[1]，篠崎文夏[1]，野原正勝[1]，豊田　集[1]，　飯尾将太[1]，　阿部啓子[1,2]　([1]地方独立行政法人　産技総研，[2]東京大学・院・農・生命科学)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A06a06　日本人健常成人の食と腸内細菌叢における短鎖脂肪酸の生産パターン
10:05　○内川彩夏[1]，田中　優[1]，余田美沙子[1]，百田理恵[1]，池田温子[2]，河口礼佳[2]，園元謙二[1]，十倉充範[2]，中山二郎[1]　([1]九大院・農，[2]味の素㈱イノベーション研)

3A06a07　日本人健常人の腸内細菌叢における胆汁酸代謝に関する研究
10:16　○余田美沙子[1]，田中　優[1]，内川彩夏[1]，百田理恵[1]，池田温子[2]，河口礼佳[2]，　園元謙二[1]，　十倉充範[2]，　中山二郎[1]　([1]九大院農，[2]味の素㈱・イノベーション研)

3A06a08　日本人乳幼児の生後 3 年間の腸内フローラの形成・成熟化と胆汁酸代謝の関連性解析
10:27　○田中　優[1]，實藤雅文[2]，諸隈誠一[2]，余田美沙子[1]，百田理恵[1]，園元謙二[1]，　加藤聖子[3]，　中山二郎[1]　([1]九大院・農，[2]九大・環境発達医学研究センター，[3]九大・医)

3A06a09　「クテドノバクテリア（綱）」のゲノム解析が明かにした新規二次代謝産物生合成の潜在能力
10:38　○鄭　　宇[1]，豊田　敦[2]，水口洋平[2]，王　瓊渓[1]，酒井康輝[1]，阿部敬悦[1]，　横田　明[1]，　矢部修平[1]　([1]東北大農，[2]国立遺伝学研究所)

3A06a10　海洋性好酸性硫黄酸化細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの遺伝子解析
10:49　○上村一雄，徳久未来，金尾忠芳　（岡山大院環境生命）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A06a11　エタノール生産性細菌 *Zymomonas mobilis* CP4 の耐熱化株における有効な変異
11:10　○加藤　舜[1,2]，　白丸優貴[2]，　山下舞子[1,3]，　村田正之[1,2,4]，松谷峰之介[1,2,4]，　高坂智之[1,2,4]，　山田　守[1,2,4]　([1]山口大院創成科学，[2]山口大農，[3]山口大院医，[4]山口大中高温微生物セ)

3A06a12　超並列シングルセルゲノム増幅産物の相互比較による高精度ゲノム解析法の開発
11:21　○小川雅人[1,2]，　西川洋平[1]，　森　一樹[2]，　細川正人[3,4]，竹山春子[1,2,3]　([1]早大先進理工，[2]産総研・早大CBBD-OIL，[3]早大ナノライフ創新研，[4]JST・さきがけ)

3A06a13　圧力感受性酵母変異株の比較ゲノム解析
11:32　○中野絢菜，野村一樹，高崎真由，井口晃徳，重松　亨，相井城太郎，田中宥司　（新潟薬大・応生科）

3A06a14　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解の効率化
11:43　○村上将和[1]，　高　未麗[1]，　松村吉信[1,2]　([1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST)

3A06a15　クラミドモナス光化学系の定量プロテオミクス法の開発
11:54　○大西一輝[1]，徳丸雄磨[1]，得津隆太郎[2]，皆川　純[2]，豊島正和[1]，松田史夫[1]，清水　浩[1]　([1]阪大院・情報，[2]基礎生物学研究所)

06 会場　午後の部（14:00〜15:27）

微生物―遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A06p01　Proteome and acylome analyses of the modification landscape created by the functional interaction between plasmid pCAR1 and host *Pseudomonas putida* KT2440
14:00　○Delyana VASILEVA[1]，　Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Saori KOSONO[1,2]，　Minoru YOSHIDA[1,2]，　Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]　([1]The Univ. of Tokyo，　[2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science（RIKEN CSRS））

3A06p02　経時的定量プロテオーム解析を用いた細胞内・分泌タンパク質一斉分析による *Clostridium cellulovorans* の植物構成多糖適応機構の解析
14:11　○油屋駿介[1,2]，　青木　航[1,3]，　黒田浩一[1]，　植田充美[1,3]　([1]京大院・農・応用生命，[2]日本学術振興会（DC[1]），[3]京都バイオ計測センター)

3A06p03　微生物による有用物質生産の改善に資する代謝モデルの反応データベースおよび配列データからの自動構築
14:22　○厨　祐喜[1]，　大山　彰[2]，　荒木通啓[1,3]　([1]神戸大院・科技イノベ，[2]インシリコバイオロジー，[3]京大院・医)

3A06p04　耐熱性メタゲノムライブラリーの構築と新規カタラーゼ開発への応用
14:33　○富安範行[1]，奥村史朗[2]，山下聡子[2]，仲山真美[3]，冨岡寛治[4]，松山　清[1]　([1]久留米高専，[2]福岡県工技セ，[3]（有）SGラボラトリー，[4]新居浜高専)

3A06p05　コーヒーノキ根圏の微生物叢解析及びカフェイン代謝菌の探索
14:44　○川上　智，矢崎一史，杉山暁史　（京大・生存研）

p06〜p07 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A06p06　機能メタゲノミクスで抗生剤投与が及ぼす乳児腸内細菌叢への影響を見る
15:05　○高見英人[1]，田中　彩[2]，下野隆一[2]，豊田　敦[3]，荒井　渉[1]，今大路治之[2]，多田雄哉[1]，桑原知巳[2]　（[1]海洋機構資源，[2]香川大医，[3]遺伝研）
3A06p07　アスリートの腸内細菌叢多様性の解析
15:16　○鈴木基生，鈴木啓太　（AuB株式会社）

A07 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A07a01　酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成制御
9:00　○神庭拓也，那須野亮，高木博史　（奈良先端大.バイオ）
3A07a02　*Fusarium graminearum* におけるオートクレーブによる毒素産生抑制効果
9:11　○田中佑弥，中嶋佑一，金丸京子，小林哲夫，木村　真　（名大院生命農）
3A07a03　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）における NO による抗生物質生産制御機構
9:22　○本間颯太，伊藤晋作，矢嶋俊介，佐々木康幸　（東農大バイオ）
3A07a04　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）M145 株における低分子チオール化合物の意義
9:33　○澁井佑生子，　佐藤　眸，　伊藤晋作，　矢嶋俊介，佐々木康幸　（東農大バイオ）
3A07a05　光量変化に対するシアノバクテリア代謝応答の解析
9:44　○丸山正晴，西口大貴，豊島正和，松田史生，清水　浩　（阪大院・情報）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A07a06　*Clostridium paraputrificum* の水素ガス生産に関わる代謝経路の分子遺伝学的解析
10:05　関　兵馬，國武絵美，粟冠真紀子，○木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生資）
3A07a07　Multidrug transporter が *Debaryomyces hansenii* の高濃度フェノール分解能に及ぼす影響について
10:16　○栗原甘奈，浜本牧子　（明治大院・農）
3A07a08　コエンザイム Q_{10} の生合成に関わる新しい遺伝子の発見と機能解析
10:27　○西田郁久，大森夕貴，柳井良太，松尾安浩，戒能智宏，川向　誠　（島根大・生物資源）
3A07a09　微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝調節機構の解明
10:38　木村光宏[1,2]，　石井侑樹[1,2]，　小川貴央[1,2]，　丸田隆典[1,2]，森　　大[3,4]，○石川孝博[1,2]　（[1]島根大生資科，[2]JST/CREST，[3]慶應大先端生命研，[4]慶應大政策・メディア）
3A07a10　比較プロテオーム解析による微細藻類ユーグレナのパラミロン代謝酵素の探索
10:49　○後藤　京[1,2]，　田中優史[1,2]，　西野耕平[1,2]，　小川貴央[1,2]，丸田隆典[1,2]，　石川孝博[1,2]　（[1]島根大学・生資科・生命工，[2]JST/CREST）

a12〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A07a11　講演取消
3A07a12　スーパー C_1 酵母の育種に向けた高メタノール環境適応の分子メカニズムの解明
11:21　川瀬貴斗，藤田千佳子，稲垣瑞穂，島田昌也，早川享志，○中川智行　（岐阜大応生）
3A07a13　*Acidomonas* 属酢酸菌のランタノイド依存性メタノール酸化系の役割
11:32　○宇都宮大貴[1]，　三井亮司[2]，　阿野嘉孝[1]　（[1]愛媛大院農・生命機能，[2]岡山理大理）
3A07a14　グリセロール環境下における *Moniliella megachiliensis* SN-124A のストレス応答
11:43　○岩田悠志[1]，松井美咲子[1]，伏屋瑞季[2]，安彦良祐[2]，春見隆文[1]，渡邉泰祐[1,2]，　荻原　淳[1,2]　（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資研究科・生資利用）
3A07a15　*Candida versatilis* SN-18 におけるマンニトールデヒドロゲナーゼの機能解析
11:54　○伏屋瑞季[1]，岩田悠志[2]，春見隆文[2]，渡邉泰祐[1,2]，荻原　淳[1,2]（[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化）

A07 会場　午後の部（14:00〜14:55）

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A07p01　*Rhizopus delemar* の育種によるフマル酸生産性の向上
14:00　○大石奈穂美[1]，　郡　彩子[1]，　村上紀里子[1]，　西村祐美[2]，髙橋史員[2]　（[1]株式会社ちとせ研究所，[2]花王・生科研）
3A07p02　高濃度・高分子量ヒアルロン酸発酵生産のメカニズムの解析
14:11　○成田琴美[1]，井上和幸[1]，村上紀里子[2]，郡　彩子[2]，武内　章[1]（[1]キユーピー株式会社 研究開発本部，[2]株式会社ちとせ研究所）
3A07p03　*Lactobacillus* GG 発酵乳のメタボローム解析
14:22　○山崎和幸，原田　岳，依田一豊，宮澤賢司，平松　優，何　　方　（タカナシ乳業㈱商品研究所）
3A07p04　好気代謝の改変による *Corynebacterium glutamicum* での効率的ピルビン酸生産
14:33　○片岡尚也[1,2]，VANGNAI Alisa S.[3]，薬師寿治[1,2]，和田　大[4]，横田　篤[4]，松下一信[1,2]　（[1]山口大院創成科学，[2]山口大中高温微セ，[3]チュラロンコン大，[4]北大院農）
3A07p05　酵母におけるフィードバック阻害非感受性型アセトヒドロキシ酸合成酵素の発現によるバリン高生産
14:44　Natthaporn TAKPHO，渡辺大輔，○高木博史　（奈良先端大バイオ）

A08 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―物質生産 - 酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A08a01　酢酸菌を宿主とした異種タンパク質発現系の構築
9:00　○繁　宥樹[1]，東久保遥[1]，石井友理[1]，赤坂直紀[2]，佐古田久雄[2]，秀瀬涼太[1]，藤原伸介[1]　（[1]関学大理工，[2]マルカン酢㈱）
3A08a02　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてタンパク質発現を増強させるイントロン配列の解析
9:11　○後藤聡志，近藤真樹，星田尚司，赤田倫治　（山口大院・創成科学・化学系）
3A08a03　新規補助遺伝子付きピキア酵母用遺伝子破壊カッセットの構築
9:22　○渋井達郎　（日本獣医生命科学大学）
3A08a04　*Pichia pastoris* を用いた Affibody と Nanobody の生産
9:33　○宮本佳奈，三浦夏子，大谷優太，柳沼謙志，青木　航，植田充美　（京大院農）

3A08a05　高純度組換え体ラット膵臓カルボキシペプチダーゼ製剤の作出
9:44　○前田　浩[1]，村山和隆[2]，渡邉君子[3]，後藤昌史[4]，山形洋平[1]（[1]東京農工大応生化，[2]東北大院医工学，[3]東北大学未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院医・移植再生医学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A08a06　*Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から見出された新規ガラクタン分解酵素
10:05　○鈴木裕満[1]，酒井杏匠[1]，新沢祐大[1]，鈴木健吾[1]，糀谷紗季[1]，山口愛彩[1]，松江　渚[1]，高須賀太一[2]，堀　千明[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]北大農）
3A08a07　*Aspergillus saitoi* が生産するペクチン分解酵素の探索と機能解析
10:16　○上條順也[1]，酒井杏匠[1]，村田俊輔[1]，志水元亨[1]，和久　豊[2]，小林哲夫[3]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]㈱ビオック，[3]名大院生命農）
3A08a08　半連続培養による *Trichoderma reesei* 由来繊維質糖化酵素の長期安定生産系の構築
10:27　○池　正和，田伏美峰，徳安　健（農研機構・食品研）
3A08a09　糸状菌 *Trichoderma reesei* においてチューブリン遺伝子欠損はタンパク質生産性を向上させる
10:38　○柴田　望[1]，掛下大視[1]，志田洋介[2]，五十嵐一暁[1]，瀧村　靖[1]，小笠原渉[2]（[1]花王・生科研，[2]長岡技科大・生物）
3A08a10　T. reesei のセルラーゼ生産性を向上させる β-グルコシダーゼの変異
10:49　○志田洋介[1]，中村彩奈[1]，服部祥吾[1]，松沢智彦[2]，矢追克郎[2]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]産総研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A08a11　PET 分解酵素 Cut190 の Ca^{2+} 結合に着目した機能構造解析
11:10　○山上由莉[1]，河合富佐子[2]，織田昌幸[1]（[1]京府大院・生環科，[2]京工繊大・繊科セ）
3A08a12　PET 分解酵素クチナーゼの Ca^{2+} 結合に伴う熱安定性と動的構造の変化
11:21　○千賀明香音[1]，山上由莉[2]，稲葉理美[2,3]，関口博史[3]，宮ノ入洋平[4]，河合富佐子[5]，織田昌幸[2]（[1]京府大・生環，[2]京府大・院生環科，[3]高輝度光科学研究センター，[4]大阪大・蛋白研，[5]京工繊大・繊科セ）
3A08a13　I 型アラビノガラクタンに作用する β-ガラクトシダーゼの基質特異性について
11:32　○近藤辰哉[1]，松山佳織[2]，西村勇一[1]，石丸　恵[2]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]近畿大院・生物理工）
3A08a14　芳香族化合物前駆体の高発酵生産へ向けた 2-deoxy-*scyllo*-inosose 合成酵素の改良
11:43　○鈴木涼子[1]，大内秀樹[2]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，宮澤大輔[3]，和田光史[3]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大，[2]新潟BRP，[3]三井化学）
3A08a15　キチン由来ヘテロ 2 糖により生産が誘導される Shewanella baltica のキチナーゼについて
11:54　○横山昌寛[1]，平野貴子[1,2]，池嶋聖史[1]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

A08 会場　午後の部（14:00〜14:55）

微生物―物質生産 - 酵素，タンパク質―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A08p01　納豆菌を用いた液体培養法によるリン酸化ポリグルタミン酸の生産に関する研究
14:00　○苔庵泰志[1]，佐合　徹[1]，梅谷かおり[1]，丸山裕慎[1]，岩本博行[2]，栗田　修[1]（[1]三重工研，[2]福山大学）
3A08p02　乳酸菌 *Lactobacillus sakei* ZH-2 株のアミノ酸変換酵素に関する研究
14:11　○松本菜月[1]，戦思とう[2]，浅見恭子[1]，金内　誠[1]（[1]宮城大学大学院，[2]東北大学大学院）
3A08p03　好熱性菌 *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 株由来新規セルラーゼの探索
14:22　○丸岡真由美，七谷　圭，横田　明，阿部直樹，矢部修平，阿部敬悦（東北大院農）
3A08p04　浸漬ワクチンの開発に向けた魚病細菌の外膜タンパク質の精製とその抗原性の評価
14:33　○三留規誉[1]，山下真泉[1]，篠原　悠[1]，濱田凪朝[1]，スンエンカーン[2]（[1]宇部高専，[2]ナンヤンポリテクニック）
3A08p05　Characterization and analysis of domain-function relationship in thermostable endolysin from template bacteriophage φOH2
14:44　○Mina Kim[1]，Mayu Hirose[2]，Martono Hindra[1]，Yuko Nagayoshi[1]，Toshihisa Oshima[3]，Yasuhiro Fujino[1,2]，Katsumi Doi[1,2]（[1]Grad. Sch. Biosc. Biotech., Kyushu Univ., [2]Fac. Agr., Kyushu Univ., [3]Fac. Eng., OIT）

A09 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A09a01　新奇乳酸菌バクテリオシンの探索および構造解析
9:00　○山城圭輔，大橋千紘，善藤威史，園元謙二（九大院・農）
3A09a02　乳酸菌由来の環状抗菌ペプチド，エンテロシン NKR-5-3B の生合成を担う EnkB2 の機能解析
9:11　○佐戸翔太[1]，池田史織[1]，高城博也[1]，杉野春貴[1]，PEREZ Rodney H.[1,2]，石橋直樹[1]，善藤威史[1]，園元謙二[1]（[1]九大院・農，[2]フィリピン大・ロスバニョス校）
3A09a03　熊本県環境中から分離した抗菌性乳酸菌の同定とそれらが生産するバクテリオシンの精製 および特性
9:22　○八浪早季[1]，山下奈菜[2]，善藤威史[3]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]九大院・農）
3A09a04　味噌漬け豆腐から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* PUK6 における多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の塩基配列決定
9:33　○河原あい[1]，山下奈菜[2]，善藤威史[3]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大院，[2]熊本県大，[3]九大院）
3A09a05　プロピオン酸菌が生産する抗菌タンパク質の探索と精製
9:44　○高屋朋彰，金子兼大，栗原瑛人，中久喜真理，檜佐　武（小山高専・物質）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A09a06　新規ラッソペプチド brevunsin の異宿主生産
10:05　○小谷真也[1]，三宅湧登[1]，中川博之[2]（[1]静大農，[2]農研機構・高度解析セ）
3A09a07　組換え大腸菌の代謝改変による 4-アミノフェニルアラニンの発酵生産
10:16　○川口秀夫[1]，若井桂子[1]，桝尾俊介[2]，高谷直樹[2]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院イノベ，[2]筑波大生命環境科学）
3A09a08　システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産
10:27　○河野祐介[1]，田中尚志[1]，城山真恵加[1]，大城　聡[1]，佐藤康治[2]，大利　徹[2]，大津厳生[1]（[1]筑波大・高細精医，[2]北大院・工）
3A09a09　カロテノイド生産のためのゲノム組換え大腸菌の創出
10:38　○竹村美保，美濃部侑香，三沢典彦（石川県大資源研）
3A09a10　赤色海洋酵母が産生する希少カロテノイドの生理機能解析
10:49　○海老原健太[1]，鈴木隆広[2]，浜本牧子[1,2]（[1]明治大院農，[2]明治大）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A09a11　オーランチオキトリウム属キサントフィル高生産変異株の作出とメタボローム情報による生産性向上
11:10　○渡邉研志[1,4], アラフィレスキム[1,4], 東　莉沙[1,4], 岡村好子[1,4], 田島誉久[1,4], 松村幸彦[2,4], 中島田豊[1,4], 松山恵介[3], 秋　庸裕[1,4]　([1]広島大院・先端, [2]広島大院・工, [3]長瀬産業株式会社, [4]CREST, JST)

3A09a12　ジアセトナミン塩酸塩添加による *Bacillus thuringiensis* 栄養増殖菌体での Cry-toxin 産生亢進の検証
11:21　○浅里仁美, 池田　陽, キムドンギョプ, 橋床泰之　(北海道大学大学院農学院)

3A09a13　単細胞微生物用界面バイオプロセスの特徴化と物質生産への応用
11:32　○窪木　遥[1], 小田　忍[2], 大箸信一[2]　([1]金沢工大院バイオ化学, [2]金沢工大ゲノム研)

3A09a14　紙パルプ発酵液からのポリベンズイミダゾール系ポリマー原料 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の精製プロセスの開発
11:43　○齋藤　駿[1,2], 勝山陽平[1,2], 宮崎翔子[2,3], 川口秀夫[2,3], 荻野千秋[2,3], アシフモハメドアリ[2,4], 金子達雄[2,4], 大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科, [2]JST・CREST, [3]神戸大院・工, [4]北陸先端大院)

A09 会場　午後の部(14:00〜14:44)

微生物―物質生産 - 酵素，タンパク質―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A09p01　2 種のガス状アルカン酸化酵素生合成過程追跡のための実験系の確立
14:00　○林　大祐[1], 寶関　淳[1,2], 由里本博也[1], 阪井康能[1]　([1]京大院農応用生命, [2]京都学園大バイオ環境)

3A09p02　卵殻膜分解活性を示す微生物由来エラスターゼの検索と特性解析
14:11　横山　萌[1], ○竹中慎治[1], 吉岡泰淳[2], 山下陽子[1], 芦田　均[1]　([1]神戸大院農・生命機能, [2]神戸大院科学技術イノベ)

3A09p03　Proteomic and biochemical analyses of plant biomass-degrading capabilities from novel insect-associated cellulolytic Streptomyces
14:22　○Keisuke OHASHI,　Taichi TAKASUKA　(Hokkaido Univ.)

3A09p04　植物アルカロイド分解微生物の探索
14:33　○熊野匠人, 栗崎　誠, 木村　澪, 橋本義輝, 小林達彦　(筑波大院・生命環境)

A10 会場　午前の部(9:00〜11:21)

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A10a01　超好熱性アーキアへのキシラン分解能の付与
9:00　○福田青郎[1], 林　千広[1], 大垣裕亮[1], 川村実央[1], 佐藤喬章[2], 金井　保[2], 跡見晴幸[2], 今中忠行[1]　([1]立命館大生命, [2]京大院工)

3A10a02　ニトロ還元酵素の解析と芳香族アミン生産への利用
9:11　○川﨑志慧, 桝尾俊介, 皆川　一, 高谷直樹　(筑波大生命環境)

3A10a03　合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
9:22　○神藤定生[1], 内山友香[2], 細田晃文[2], 田村廣人[2]　([1]名城大理工, [2]名城大農)

3A10a04　大腸菌の D-アラニン排出輸送体の同定
9:33　○酒井啓一郎,　勝部　哲,　安藤太助,　磯貝恵美子, 米山　裕　(東北大農)

3A10a05　リン酸存在における最適な土壌金属量の解析
9:44　○嶋岡邦彦, DINESH Adhikari, 荒木希和子, 久保　幹　(立命館生命科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A10a06　糸状菌胞子を用いた新規な微生物変換プロセス
10:05　○林　優佑[1], 宮崎裕人[1], 小田　忍[2], 大箸信一[2]　([1]金沢工大院バイオ化学, [2]金沢工大ゲノム研)

3A10a07　遺伝子組換え *Acinetobacter* sp. Tol 5 を用いた citral の生物変換に関わる代謝経路の特定
10:16　○宇佐見享嗣, 石川聖人, 堀　克敏　(名大院工)

3A10a08　ジオール類の不斉酸化による光学活性ヒドロキシアルカン酸の微生物合成
10:27　○菊川寛史[1], 子安伶奈[2], 八十原良彦[3], 伊藤紀幸[3], 滿倉浩一[1], 吉田豊和[1]　([1]岐阜大工・化生工, [2]岐大院工・生命工, [3]㈱カネカ)

3A10a09　大腸菌を宿主とした人工代謝経路による糖質炭素源からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体生合成
10:38　○齊藤　周, 折田和泉, 中村　聡, 福居俊昭　(東工大院・生命理工)

3A10a10　*Methylobacterium extorquens* の代謝改変によるメタノールを原料にしたポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成
10:49　○折田和泉, 海野源人, 加藤りさ, 中村　聡, 福居俊昭　(東工大院生命理工)

a11 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A10a11　*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した ethyl *α*-D-glucopyranoside の高収量生産
11:10　恩田　裕, ○渡邉理沙, 中里美穂, 桐村光太郎　(早大・先進理工・応化)

A10 会場　午後の部(14:00〜16:00)

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A10p01　*Gluconobacter frateurii* CHM43 耐熱化育種株における一遺伝子変異に基づく代謝変動を介した耐熱化機構
14:00　○松本奈実[1],　服部浩美[1],　松谷峰之介[1],　外山博英[2], 片岡尚也[1,3],　薬師寿治[1,3],　松下一信[1,3]　([1]山口大院創成科学, [2]琉球大院農, [3]山口大中高温微セ)

3A10p02　酢酸菌の $Na^+(K^+)/H^+$ アンチポーター(NhaK2)は *Acetobacter pasteurianus* の耐熱性に寄与する
14:11　○松下一信[3,4],　末吉里帆[1],　古川藍子[1],　辰野真木[1], ソエンホールビッチャイ[2], 松谷峰之介[3], 松本奈実[3], 片岡尚也[3,4], 薬師寿治[3,4]　([1]山口大農, [2]コンケン大, [3]山口大院創成科, [4]山口大中高温微セ)

3A10p03　酢酸菌の膜結合型アルデヒド脱水素酵素の分子種と発現：酢酸発酵との関連
14:22　福成聖也[1],　松谷峰之介[2],　○薬師寿治[1,2,3],　片岡尚也[1,2,3], ガンジャナティーラグール[4],　松下一信[1,2,3]　([1]山口大農, [2]山口大院創成科学, [3]山口大微研セ, [4]カセサート大)

3A10p04　酢酸菌の酸化発酵におけるシアン耐性呼吸鎖の役割
14:33　○三由綾香, 内藤朋子, 阿野嘉孝　(愛媛大院農・生命機能)

3A10p05　*Acetobacter* 属細菌で複製可能なプロモーター検索ベクターの開発
14:44　○中村　匡, 石井正治, 新井博之　(東大院・農生科)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A10p06　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸代謝におけるメチルクエン酸経路およびピルベートフォスフェートジキナーゼの機能
15:05　○塚田泰之[1]，石川森夫[1]，鈴木敏弘[1]，大西直人[2]，傳寶雄大[2]，吉田将也[1]，兼崎　友[3]，福崎英一郎[2]，貝沼(岡本)章子[1]（[1]東京農大・応生科・醸造，[2]阪大院・工，[3]東京農大・ゲノムセ）

3A10p07　*Acetobacter* 属酢酸菌の酢酸過酸化時における TCA サイクル周辺経路の機能解析
15:16　○佐々木大樹[1]，石川森夫[1]，鈴木敏弘[1]，今井健太郎[1]，山本有紀[1]，松原拓哉[1]，兼崎　友[2]，貝沼(岡本)章子[1]（[1]東京農大・応生科・醸造，[2]東京農大・ゲノムセ）

3A10p08　*Corynebacterium glutamicum* 中央代謝酵素間におけるメタボロン形成の探索と解析
15:27　○山﨑　史[1,2]，村井恵一[1]，吉田　稔[3,4]，西山　真[1]，古園さおり[1,3]（[1]東大・生物工学セ，[2]協和発酵バイオ，[3]理研 CSRS，[4]東大院農生科）

3A10p09　*Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 超複合体のサブユニット構造解析
15:38　○衣川寛知[1]，小峰理乃[1]，西山　真[1]，古園さおり[1,2]（[1]東大生物工学セ，[2]理研CSRS）

3A10p10　*Meiothermus ruber* H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase（PDO）発現増強株の羽毛分解への影響
15:49　○武田梨花，西　海斗，渡部邦彦（京府大院生命環境）

A11 会場　午前の部(9:00〜12:05)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A11a01　発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を用いた芳香環を含むポリエステルの化学合成と生分解
9:00　○常盤　豊[1]，中山敦好[1]，川崎典起[1]，山野尚子[1]，伊田小百合[1]，楽　隆生[2]，世嘉良宏斗[3]（[1]産総研，[2]甲南化工，[3]沖縄県工技セ）

3A11a02　脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解（II）
9:11　○中山敦好，川崎典起，山野尚子（産総研）

3A11a03　海水によるポリアミド 4 分解
9:22　○山野尚子，川崎典起，中山敦好（産総研）

3A11a04　*Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる 2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル(CB118)の代謝とその構造基盤
9:33　後藤絵里香[1]，羽賀雄紀[2]，久保　淳[3]，伊藤俊将[3]，笠井千枝[4]，荘司長三[4]，山本恵子[3]，松村千里[2]，中野　武[5]，○乾　秀之[1,6]（[1]神戸大院農，[2]兵庫県環境研セ，[3]昭和薬科大院，[4]名古屋大院理，[5]大阪大環境安全研究管理セ，[6]神戸大バイオ）

3A11a05　*Rhodococcus jostii* RHA1 における *β*-ケトアジピン酸経路から分岐する新規異化経路
9:44　○戸塚直希[1]，増田恵実[1]，山梨智也[1]，長谷部文人[1]，原　啓文[2]，鮒　信学[1]（[1]静県大食栄，[2]マレーシア工科大マ日国際工科環境）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A11a06　フィンランド・ラップランドのパルサ崩壊地の泥炭から高 N_2O 放出細菌株の分離，それらの挙動および脱窒遺伝子の解析
10:05　○阿知和菜子[1]，ヤンシャニェ[1]，ターバナイネンテムー[2]，橋床泰之[1]（[1]北大院農，[2]東フィンランド大）

3A11a07　ヒ素高蓄積植物モエジマシダ根圏からの亜ヒ酸酸化細菌の単離と解析
10:16　○宮内啓介，森　秀成，阿部凌平，堀内孝人，遠藤銀朗（東北学院大工）

3A11a08　鉄鋼スラグから鉄溶出を促進する微生物の探索と同定
10:27　○月舘秀典[1]，吉村　航[2]，永田宏次[1]，吉村悦郎[3]，鈴木道生[1]（[1]東京大農，[2]新日鐵住金株式会社，[3]放送大）

3A11a09　海洋環境における生分解性プラスチック PHBH 分解菌の探索とその分解能
10:38　○能木裕一[1,2]，本間　絢[1,2]，加藤千明[3]（[1]海洋研究開発機構・深海バイオ，[2]横浜市大・生命ナノ，[3]海洋研究開発機構・多様性）

3A11a10　Biotransformation of phenolic compounds by Bacillus licheniformis strain TAB7
10:49　○Enock Mpofu[1]，Chiho Suzuki-Minakuchi[1]，Felipe Vejararo[1]，Joydeep Chakraborty[1]，Toshiaki Kimura[2]，Kazunori Okada[1]，Hideaki Nojiri[1]（[1]The Univ. of Tokyo，[2]Toyota Motor Corp.）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A11a11　Isolation and characterization of dibenzofuran degrading bacteria from Vietnamese soil
11:10　○NGOC THI TRAN VU[1,3]，HA THANH LE THI[1,3]，MASAKI SHINTANI[2]，HOANG LOC NGUYEN[3]，KAZUHIDE KIMBARA[1]（[1]Department of Environment and Energy System，Graduate School of Science and Technology，Shizuoka Univ.，Japan，[2]Department of Bioscience，Graduate School of Science and Technology，Shizuoka Univ.，Japan，[3]Hue College of Sciences，Hue Univ.，Vietnam）

3A11a12　Genome sequence analysis of dibenzofuran degrading bacteria and cloning of its degradation genes
11:21　○HA THANH LE THI[1,4]，NGOC THI TRAN VU[1,4]，MASAKI SHINTANI[2]，RYOTA MORIUCHI[3]，HIDEO DOHRA[3]，HOANG LOC NGUYEN[4]，KAZUHIDE KIMBARA[1]（[1]Department of Environment and Energy System，Graduate School of Science and Technology，Shizuoka University，Japan，[2]Department of Bioscience，Graduate School of Science and Technology，Shizuoka University，Japan，[3]Research Institute of Green Science and Technology，Shizuoka University，Japan，[4]College of Sciences，Hue University，Vietnam）

3A11a13　白色腐朽菌によるアセタミプリド分解に関与するシトクロム P450 遺伝子の同定
11:32　○大野　遥[1]，一瀬博文[2]，森　智夫[1]，河岸洋和[1,3,4]，平井浩文[1,3]（[1]静大農・応生科，[2]九大院・農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3A11a14　*Paraburkholderia* sp. KU-46 株の 2,4-DNP 分解系遺伝子の解析
11:43　○山本泰誠，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大学）

3A11a15　絶対嫌気性菌の安定的な大量培養法の提案
11:54　○内野佳仁（製品評価技術基盤機構）

A11 会場　午後の部(14:00〜16:00)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A11p01　微生物と線虫を用いた生物濃縮による ^{137}Cs 除染法の検討
14:00　○合田　亮[1]，伊藤みさご[1]，星　英之[2]，倉橋健介[3]，吉原静恵[4]，徳本勇人[4]（[1]阪府大院・工，[2]阪府大院・人社，[3]阪府大高専，[4]阪府大院・理）

3A11p02　重金属含有バイオマスにおける微生物と線虫を用いたバイオレメディエーションプロセスの構築
14:11　○岡野凌一[1]，濵野　樹[2]，倉橋健介[3]，吉原静恵[2]，徳本勇人[2]（[1]阪府大院・工，[2]阪府大院・理，[3]阪府大高専）

3A11p03　活性炭とバイオレメディエーションの組み合わせによる土壌浄化技術の開発
14:22　○川越大樹[1,2]，久保田謙三[1]，河目裕介[1]，吉田和生[1]，アディカリディネシュ[2]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]（[1]大和ハウス工業，[2]立命館大学）

3A11p04　PGA イオンコンプレックスを利用した活性炭の効率的な除菌担体化
14:33　○白米優一[1]，山口かなえ[2]，芦内　誠[1,2]　([1]愛媛大院連合農，[2]高知大農)

3A11p05　微生物を利用した新規汚泥減容化システム
14:44　○柳瀬亜美[1]，黒住　悟[2]，石田秀樹[2]，倉根隆一郎[1]　([1]中部大学，[2]積水アクアシステム株式会社)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A11p06　四塩化炭素汚染地下水における浄化処理後の微生物叢解析
15:05　○吉田拓也，高品知典　(東洋大院・生命科学)

3A11p07　海洋微生物の環境汚染物質分解への利用と機構解明
15:16　○四方浩貴，鎌田泰彰，安部智子，椎葉　究　(東京電機大)

3A11p08　セレン酸還元細菌 Pseudomonas stutzeri NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 3)
15:27　○小竹史哉[1]，大塚　治[2]，山下光雄[1]，西里　亮[3]，奥野　稔[3]，武藤宏行[3]，佐々木雄一[3]　([1]芝浦工大 工 応化，[2]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター，[3]株式会社ケー・エフ・シー)

3A11p09　*Rhodococcus erythropolis* PR4 株を用いた微生物細胞入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性
15:38　○田上晃二，岩淵範之，砂入道夫　(日大生資科　応生科)

3A11p10　ウキクサの根圏に形成される細菌群集による 4-*tert*-butylphenol の分解促進
15:49　○西野優希，黒田真史，井上大介，池　道彦　(阪大院工)

A12 会場　午前の部(9:00〜11:54)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A12a01　シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からのバイオコハク酸生産
9:00　○小山内崇，飯嶋寛子，鋤柄春奈　(明治大農)

3A12a02　自然界からのバイオポリマーを生産する微生物の単離と応用
9:11　○堀口凌佑[1]，小池美弥[1]，谷川　実[1]，西村克史[1,2]　([1]日大理工，[2]日大短大)

3A12a03　組換え微生物による実用的なポリヒドロキシアルカン酸の生合成
9:22　○森　恵美[1]，西上明花[2]，後藤早希[1]，阿部英喜[3]，田中賢二[4]，松崎弘美[1,2]　([1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]理研-CSRS，[4]近畿大・産理工)

3A12a04　透明性を有する新規乳酸ベースポリマーの生合成
9:33　○後藤早希[1]，龍野菜々美[2]，松本謙一郎[3]，阿部英喜[4]，田口精一[5]，田中賢二[6]，松崎弘美[1,2]　([1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]北大院・工，[4]理研-CSRS，[5]東農大・生命科学，[6]近大・産理工)

3A12a05　高温メタン発酵過程における生分解性プラスチックの分解機構の解析
9:44　○曽　厚嘉，大西章博，藤本尚志，蒋　紅与　(東農大)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A12a06　*Pseudomonas* sp. ITH-B52 の生産する有機蛍光物質の化学的性質の検討
10:05　○守屋佑里子[1]，遠藤実夏[1]，坂野優稀[1]，松藤　寛[2]，岩淵範之[1]，砂入道夫[1]　([1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・食生科)

3A12a07　リグニン由来の芳香族化合物を変換して生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質について
10:16　○岩淵範之[1]，坂野優稀[1]，松藤　寛[2]，砂入道夫[1]　([1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・食生科)

3A12a08　市販牛乳酵素分解物からの有機蛍光物質生産について
10:27　○廣川侑美[1]，大槻　崇[1]，岩淵範之[2]，松藤　寛[1]　([1]日大・生資科・食生，[2]日大・生資科・応生)

3A12a09　糖質に依存しないリグニン由来フェノール類からの *cis,cis*-ムコン酸生産
10:38　○杉田晴佳[1,3]，畑村美波[1,3]，高橋健司[2,3]，上村直史[2,3]，政井英司[2,3]，園木和典[1,3]　([1]弘前大・農学生命，[2]長岡技大・生物，[3]JST-ALCA)

3A12a10　*Halomonas* sp. KM-1 株による好気培養条件下でのオキサロ酢酸の効率的な分泌生産
10:49　○河田悦和[1]，盤若明日香[2]，西村　拓[2]，松下　功[2]，坪田　潤[2]　([1]産総研，[2]大阪ガス)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A12a11　メタノール資化性酢酸菌 *Acidomonas methanolica* のグリセリン酸生産能
11:10　○佐藤　俊[1]，羽部　浩[2]　([1]産総研・機能化学，[2]産総研・環境管理)

3A12a12　中度好塩性細菌ハロモナスにおける不揮発性腐敗アミンからのエクトイン生産
11:21　○仲山英樹，河本　亮　(長崎大院水環)

3A12a13　Enhanced alkylresorcinol (ARs) production in cyst of Azotobacter vinelandii A81 by culturing with surfactants
11:32　○RAHUL JOG[1]，SHIGERU HIRAMOTO[2]，YASUSHI OHGO[2]，MASAAKI MORIKAWA[1]　([1]Hokkaido Univ.，[2]Nisshin Pharma Inc.)

3A12a14　ソルガムにおける亜テルル酸吸収と特異的還元系の解析
11:43　○渡部翔太[1]，中條滉叡[2]，武田　徹[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農)

A12 会場　午後の部(14:00〜15:49)

環境科学・バイオマス利用―バイオ電池関連―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A12p01　ニトロゲナーゼを高発現する鉄酸化細菌を用いた微生物電気化学的アンモニア生産
14:00　○山田祥平，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大生命)

3A12p02　高電圧バイオ電池構築のための酸化還元電位シフトを目指した超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの遺伝子改変
14:11　○高村映一郎[1]，坂元博昭[2]，里村武範[3,4]，櫻庭春彦[5]，大島敏久[6]，末信一朗[2,3,4]　([1]福井大学院・工・総合，[2]福井大学院・工・繊維，[3]福井大学院・工・生物応用化，[4]福井大学・生命セ，[5]香川大農，[6]大阪工大)

3A12p03　電極-酵素界面における異種間電子移動の距離依存性解析
14:22　○鈴木治人[1]，中村卓登[2]，高村映一郎[3]，坂元博昭[2,5]，里村武範[4,5]，櫻庭春彦[6]，大島敏久[7]，末信一朗[2,4,5]　([1]福井大学・工・生物応用化，[2]福井大学院・工・繊維，[3]福井大学院・工・総合，[4]福井大学院・工・生物応用化，[5]福井大学・生命セ，[6]香川大農，[7]大阪工大)

3A12p04　バイオ電池電極への酵素固定化のためのカーボンナノチューブ結合ペプチドの応用
14:33　○渡辺好一[1]，殿岡愛菜[2]，坂元博昭[2,4]，里村武範[3,4]，櫻庭春彦[5]，大島敏久[6]，末信一朗[2,3,4]　([1]福井大学・工・生物応用化，[2]福井大学院・工・繊維，[3]福井大学院・工・生物応用化，[4]福井大学・生命セ，[5]香川大農，[6]大阪工大)

3A12p05　電極を電子供与体とした *Shewanella oneidensis* MR-1 株の増殖
14:44　○廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大生命)

p06〜p09 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A12p06　FAD 依存性グルコース脱水素酵素の安定性に対する電解質の影響
15:05　○根本美貴，安立　翼，椙原和法，辻村清也　（筑波大数理物質科学）

3A12p07　アントシアニンと助色素を共吸着させた色素増感太陽電池の研究
15:16　○酒井勇輔[1]，尾山公一[2]，若宮淳志[3]，村田靖次郎[3]，近藤忠雄[1]，吉田久美[1]　([1]名大院情報学，[2]名大物国セ，[3]京大化研)

3A12p08　液膜型硝酸イオンセンサーの開発と水耕栽培培養液および土壌中の硝酸イオンのモニタリング
15:27　○中尾英策，白井　理，北隅優希，加納健司　（京大院農）

3A12p09　油脂資化性酵母 *Meyerozyma guilliermondii* TY-89 のアシルグリセロール資化特性
15:38　○小林由衣乃[1]，　日下部征信[1]，　竹園　恵[1]，　中島敏明[2]，茂野俊也[3]，　小野寺正幸[1]　([1]新潟工大工，[2]筑波大院生命環境，[3]つくば環微研)

A13 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A13a01　新規 *in vitro* 運動モデルの確立及び β-ヒドロキシ-β-メチル酪酸(HMB)の作用メカニズム解析への応用
9:00　○佐藤聡子[1]，高村裕介[1]，山名一綱[1]，野村　充[1]，内山　章[1]，古市泰郎[2]，　眞鍋康子[2]，　藤井宣晴[2]　([1]ライオン株式会社 研究開発本部，[2]首都大学東京 人間健康科学研究科)

3A13a02　β_2 アドレナリン受容体の発現を促進する食品成分の探索とその成分による筋機能改善効果
9:11　○近澤未歩，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎　（東大院農生科・応生化）

3A13a03　マスリン酸による筋肥大効果の解析
9:22　○村田翔太朗，　佐々木崇，　清水　誠，　井上　順，佐藤隆一郎　（東大院農生科・応生化）

3A13a04　脳梗塞重症化予防効果を持つ食品成分探索のためのヒトバイオマーカーの開発
9:33　○田熊彩子[1]，斎藤芳和[1]，阿部　新[2]，上田雅之[3]，仁藤智香子[2]，木村和美[2]，　阿部啓子[1,4]，　朝倉富子[1]　([1]東大院・農生科，[2]日医大，[3]多摩総合医療センター，[4]KISTEC)

3A13a05　In vitro 潰瘍性大腸炎患者大腸フローラモデルの構築
9:44　○佐々木建吾[1]，　井上　潤[2]，　星奈美子[2]，　佐々木大介[1]，近藤昭彦[1]，大澤　朗[3]　([1]神戸大・科学技術イノベ，[2]神戸大・医，[3]神戸大・農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A13a06　微細藻類ユーグレナの経口摂取が排便および腸内細菌叢に及ぼす影響
10:05　○中島綾香，安田光佑，鈴木健吾　（株式会社ユーグレナ）

3A13a07　睡眠の質改善素材 " 清酒酵母 " による日中の疲労改善と活力向上機能
10:16　○永盛友樹[1]，平尾香織[1]，物井則幸[1]，内山　章[1]，裏出良博[2]　([1]ライオン㈱，[2]筑波大 WPI-IIIS)

3A13a08　酸化食用油による神経細胞死誘導機構
10:27　○上野有紀[1]，川本善之[2]，中根大和[1]，夏目梨冴[1]，三浦叶子[1]，大澤俊彦[1]　([1]愛知学院大心身科学，[2]中部大生命健康)

3A13a09　酒粕の腸クロム親和性細胞に対するセロトニン産生促進効果
10:38　○柴田裕介，山田　翼，田中伸哉　（菊正宗・総研）

3A13a10　種々の日本産ショウガ(Zingiber offinale)のプロテアーゼ活性の評価に関する研究
10:49　○山田徳広[1]，津村和伸[2]，苔庵泰志[3]，梅谷かおり[3]，清水　純[4]，栗田　修[3]　([1]津市立三重短大，[2]不二製油グループ本社㈱，[3]三重県工業研，[4]城西大)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A13a11　果実・野菜エキスの生産効率を高める技術の開発　1)タマネギ
11:10　○三輪章志[1]，吉田郁子[1]，田中伸一郎[2]　([1]石川県農総研，[2]三菱ケミカルフーズ)

3A13a12　果実・野菜エキスの生産効率を高める技術の開発　2)リンゴ
11:21　○吉田郁子[1]，三輪章志[1]，田中伸一郎[2]　([1]石川県農総研，[2]三菱ケミカルフーズ)

3A13a13　糖類添加培養によるナットウキナーゼの生産
11:32　○太田さくら[1]，柳澤泰任[1]，内藤佐和[2]，足立達美[1]，須見洋行[2]　([1]千葉科学大薬，[2]倉敷芸術科学大生命科学)

3A13a14　D 体アミノ酸添加によるナットウキナーゼ増産
11:43　○柳澤泰任[1]，大杉忠則[2]，矢田貝智恵子[2]，須見洋行[2]　([1]千葉科学大学薬学部，[2]倉敷芸術科学大学生命科学部)

3A13a15　赤茎ホウレンソウの特徴の解析と機能性向上を目指した水耕栽培系の確立
11:54　○渡辺　祥[1]，青木　航[1,3]，宇野祐子[2]，助清泰教[2]，窪川清一[2]，植田充美[1,3]　([1]京大院・農・応用生命，[2]三菱ケミカル，[3]KISTIC-BIC)

A14 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A14a01　イネいもち病菌における pyriculol 類生合成関連 aldo/keto reductase 遺伝子の機能解析
9:00　○古山祐貴[1,2]，本山高幸[2]，野川俊彦[2]，清田洋正[3]，鎌倉高志[1]，長田裕之[2]　([1]東理大院理工・応生，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[3]岡山大院・環境生命)

3A14a02　テヌアゾン酸の環状骨格形成を担うケトシンターゼドメインの結晶化解析
9:11　○尹　忠銖[1]，西本一希[2]，本山高幸[1]，日野智也[2]，永野真吾[2]，長田裕之[1]　([1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]鳥取大院・工・化学生物)

3A14a03　リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の機能解析
9:22　○鬼頭奈央子[1]，高橋俊二[1]，佐藤裕美[1]，奥村英夫[2]，熊坂　崇[2]，長田裕之[3]　([1]理研 CSRS・天然物生合成，[2]高輝度光科学研究センター，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

3A14a04　アニオンチャネルの部位特異的発現と覚醒物質の局在がアメリカネムノキの葉を開く運動に関与する
9:33　○竹内優輔，及川貴也，鷲山研人，石丸泰寛，上田　実　（東北大院理）

3A14a05　オスモライトであるアミン-N-オキシドの化学構造が酵素活性，安定性に及ぼす影響
9:44　○青木拓真，源嶋龍太郎，中川雄市，甲元一也　（甲南大 FIRST）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A14a06　がん代謝阻害剤スクリーニングと呼吸阻害作用解析
10:05　○室井　誠[1]，二村友史[1]，青野晴美[1]，川谷　誠[1]，関根朋美[1]，野川俊彦[1]，　林田莉奈[1,2]，　長田裕之[1,2]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大院・理工)

3A14a07　がん代謝を阻害するプレニルフラボノイドの作用機序解析
10:16　○二村友史[1], 青野晴美[1], 佐竹華子[1,2], 室井　誠[1], 川谷　誠[1], 野川俊彦[1], 井本正哉[2], 長田裕之[1]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, [2]慶應大・理工)

3A14a08　酵母 tafazzin によるカルジオリピンのリモデリング反応の基質特異性
10:27　○安部真人, 澤田良樹, 宇野晋平, 千ヶ崎修平, 奥　公秀, 阪井康能, 三芳秀人　(京大院農)

3A14a09　出芽酵母ミトコンドリアの VDAC を阻害するペンテンジオール類縁体の作用機構研究
10:38　○運天優歩[1], 村井正俊[1], 一丸直哉[1], 山本武範[2], 篠原康雄[2], 三芳秀人[1]　([1]京大院農・応用生命, [2]徳島大・先端酵素研)

3A14a10　ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン類の作用機構研究
10:49　○青山綾希, 村井正俊, 一丸直哉, 三芳秀人　(京大院農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A14a11　がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物のスクリーニング
11:10　○河村達郎[1,2], WILKE Julian[1,2], 渡辺信元[1,3], ZIEGLER Slava[2], WALDMANN Herbert[2], 長田裕之[1,4]　([1]理研 CSRS・理研-マックスプランク連携, [2]マックス・プランク分子生理学研究所, [3]理研CSRS・生理活性物質探索, [4]理研CSRS・ケミカルバイオロジー)

3A14a12　がん代謝研究を加速するオミックス解析基盤の構築
11:21　○佐竹華子[1,2], 二村友史[1], 室井　誠[1], 野川俊彦[1], 川谷　誠[1], 井本正哉[2], 長田裕之[1]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, [2]慶應大・理工)

3A14a13　呼吸鎖複合体-I におけるアミロライド類の結合部位の同定
11:32　○木村洋則, 村井正俊, 三芳秀人　(京都大院農・応用生命)

3A14a14　コレラ菌 Na^+ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素における阻害剤結合部位の同定
11:43　○伊藤　剛[1], 二ノ倉聡[1], 村井正俊[1], 北隅優希[1], BARQUERA Blanca[2], 三芳秀人[1]　([1]京大院・農, [2]ロンセラー工科大・生物科学)

3A14a15　代謝産物を基体に合成されたベタイン型添加剤を利用する ELISA の低コスト化, 高感度化
11:54　○三宅子龍, 高木琴味, 甲元一也　(甲南大FIRST)

A14 会場　午後の部(14:00〜15:49)

有機化学, 天然物化学
—天然物 - ケミカルバイオロジー, 作用機構—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A14p01　環状ペプチドマルホルミンが賦活化する細胞性血栓溶解には RSK1 の活性化が関与する
14:00　○小泉幸央[1], 長井賢一郎[2], 高　立娜[1], 山口智和[1], 夏井美幸[1], 今井由美子[1], 蓮見恵司[3], 杉山俊博[1], 久場敬司[1]　([1]秋田大院医, [2]北里大薬, [3]農工大院農)

3A14p02　マキ科植物由来成分 nagilactone E が出芽酵母の細胞形態に及ぼす影響
14:11　○林　謙吾[1], 尾山昌弘[2], 山口良弘[1,3], 荻田　亮[1,4], 田中俊雄[1], 藤田憲一[1]　([1]阪市大院・理, [2]阪市大・理・生物, [3]阪市大・複合先端, [4]阪市大・健康・研セ)

3A14p03　クアシノイド類の脂肪分解促進活性に関する構造活性相関研究
14:22　○岩田稜平[1], 加藤英介[2], 川端　潤[2]　([1]北大農, [2]北大院農)

3A14p04　神経保護物質ネオエキヌリン A の結合タンパク質の同定
14:33　○紙透伸治[1], 姫野なつみ[2], 鶴川幸音[1], 草柳友恵[2], 竹野正洋[2], 鎌倉高志[2], 倉持幸司[2], 菅原二三男[2]　([1]麻布大獣医, [2]東理大理工)

3A14p05　代謝産物ベタインのアナログによる構造依存的な金ナノ粒子の凍結凝集抑制効果
14:44　○山本真史, 中川雄市, 甲元一也　(甲南大FIRST)

p06〜p09 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A14p06　環状ペプチド PF1171F の生体内環境における立体配座の NMR による解析
15:05　○増田裕一[1], 佐野萌佳[1], 本田将也[1], 赤木謙一[2]　([1]三重大生物資源, [2]医薬基盤健康栄養研)

3A14p07　ホタル発光基質と哺乳類内在性酵素による発光現象の解明
15:16　○齊藤亮平[1,2], 仲村厚志[1,2], 平野　誉[1], 牧昌次郎[1,2]　([1]電気通信大学　大学院情報理工学研究科　基盤理工学専攻, [2]電気通信大学　脳科学ライフサポートセンター)

3A14p08　Ginkgolic acid, a Natural Sphingomyelin Synthase Inhibitor Inspiring "Sphingo-mimic"
15:27　○Mahadeva Swamy MAKANAHALLI MADEGOWDA[1], Yuta MURAI[2], Yusuke OHNO[3], Yoshiko SUGA[2], Masaki ANETAI[2], Jian YU[2], Min YAO[2], Akio KIHARA[3], Kenji MONDE[2]　([1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, [2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

3A14p09　新規リモノイドによる生活習慣病改善効果の検討
15:38　○松本ちひろ[1], 馬場　靜[1], 田中麗子[2], 藤森　功[1]　([1]大阪薬大・病態生化学, [2]大阪薬大・医薬品科学)

A15 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学, 天然物化学
—天然物 - ケミカルバイオロジー, 作用機構—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A15a01　様々な生物種の生育を抑制するジテルペノイド化合物モミラクトンの作用機序解析
9:00　○富田啓介[1], 松尾安浩[2], 川向　誠[2], 八代田陽子[3], 吉田　稔[3,4], 三橋　渉[5], 野尻秀昭[1], 岡田憲典[1]　([1]東大・生物工学セ, [2]島根大・生物資源, [3]理研・環境資源, [4]東大・農生科・応生化, [5]山形大・農)

3A15a02　イネが生産する (*R*)-*β*-tyrosine のシロイヌナズナにおける根の生育阻害活性
9:11　○中道雅貴, 中田　隆, 吉永直子, 小林　優, 寺石政義, 奥本　裕, 森　直樹　(京大農)

3A15a03　アミロイド *β* とカフェ酸エステル誘導体型凝集阻害剤の核磁気共鳴法による相互作用解析
9:22　○杉浦亜美[1], 馬渡康輝[2], 田口莉帆[2], 関　千草[2], 中野博人[2], 徳樂清孝[2], 上井幸司[2]　([1]室工大, [2]室工大院工)

3A15a04　Activity of Eurycomanone and Epoxy-eurycomanone on Lipid Metabolism in WT-1 Brown Adipocytes
9:33　○Lucy LAHRITA[1], Eisuke KATO[1], Yu-Hua TSENG[2], Jun KAWABATA[1]　([1]Hokkaido University, Japan, [2]Joslin Diabetes Center, USA)

3A15a05　X 線照射下でのケルセチン修飾体の ROS 発生能評価およびがん細胞への影響評価
9:44　○倉田佳苗[1], 外山実千留[2], 森　崇[1], 山内恒生[1], 光永　徹[1], 岩橋　均[1], 高橋淳子[3]　([1]岐阜大学応生, [2]朝日大学口腔研, [3]産総研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A15a06　昆虫グルタミン酸作動性塩素チャネルの多様性とインドールアルカロイドコムネシンの活性化作用
10:05　○野口　晃[1], 橋本杏樹[1], 古谷章悟[3], 奥原大樹[1], 伊原　誠[1], 甲斐建次[2], 林　英雄[2], 松田一彦[1]　([1]近畿大院・農, [2]阪府大農・生環科, [3]理研)

3A15a07　ピレスリン生合成酵素 TcGLIP に対する有機リン酸エステル型阻害剤の活性評価
10:16　○髙松元紀[1], 伊原　誠[1], 松尾憲忠[2], 松田一彦[1]　([1]近畿大院・農, [2]関学・理)

3A15a08　Easy isolation of pure betanin from red beetroots as substrate for an effective imine-exchange reaction to obtain several betalamic acid-aldimine derivatives
10:27　○Jie DUAN, Junichi ASANO, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

3A15a09　YM-53601 によるスクアレン合成酵素の光分解機構の解析
10:38　○竹本　靖[1], マオディ[1], ゴツェセバスチャン[1], 上杉志成[1,2] ([1]京大化研, [2]京大iCeMS)

3A15a10　Antibacterial activity of a novel porphyrin derivative isolated from harmful red tide phytoplankton *Heterocapsa circularisquama*
10:49　○Wencheng LI, Tatsuya ODA (Nagasaki Univ.)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A15a11　ショウジョウバエニコチン性アセチルコリン受容体 Dα1 サブユニットの YXCC モチーフ構造とネオニ コチノイド感受性
11:10　○疋田麻衣, 奥原大樹, 伊原　誠, 松田一彦 (近畿大院農)

3A15a12　カイコガ pH 感受性塩素チャネルの膜貫通領域欠損型バリアントの機能解析
11:21　○奥原大樹, 野口　晃, 伊原　誠, 松田一彦 (近畿大院・農)

3A15a13　N,N-ジメチルスフィンゴシンによる神経疼痛に関わる神経伸長因子とチロシンキナーゼ A の相互作用研究
11:32　○関口晃弘[1], 村井勇太[2], 臼杵靖剛[2], 門出健次[2] ([1]北海道大学　理学部, [2]北海道大学　大学院生命科学院)

3A15a14　哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムの分子機構
11:43　○伏見圭司[1], 宮崎剛亜[2], 山本達郎[1], 竹田百花[1], 桑崎勇人[3], 中嶋隆浩[3], 榎本　元[3], 池内昌彦[3], 朴　龍洙[2], 佐藤守俊[3], 成川　礼[1] ([1]静大・理学, [2]静大・グリーン, [3]東大・総合)

3A15a15　ゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーニングによるアポトーシス誘導物質 JBIR-140 の標的経路の解析
11:54　○高瀬翔平[1,2], 近藤恭光[3,4], 鈴木健裕[5], 堂前　直[5], 新家一男[6], 長田裕之[3,4], 久城哲夫[2], 松本　健[1,7,8], 吉田　稔[1,7,8] ([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス, [2]明治大院・農, [3]理研CSRS・ケミカルバイオロジー, [4]理研CSRS・創薬ケミカルバンク, [5]理研CSRS・生命分子解析, [6]産総研・創薬基盤, [7]理研・化学遺伝学, [8]理研CSRS・創薬シード)

A15 会場　午後の部(14:00〜16:00)

有機化学，天然物化学
—天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構/医薬—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A15p01　EPA・DHA によるメラニン合成抑制およびメラノーマ細胞腫瘍増殖抑制機構の解明
14:00　○箱崎真友佳[1], 山下哲郎[2], 山田秀俊[1] ([1]岩手生工研, [2]岩手大・農)

3A15p02　カビ毒オクラトキシン A が示すエピジェネティック変異原活性の可視化検出
14:11　○杉山圭一, 古沢博子, グルーズピーター, 本間正充 (国立医薬品食品衛生研究所)

3A15p03　新しいタイプのヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin の作用機構
14:22　○長尾勇希[1], 岡島俊英[2], 五十嵐雅之[3], 江口陽子[4], 清水莉子[1], 犬飼洋一[1], 村井春香[5], 加藤明宣[1], 内海龍太郎[1] ([1]近畿大院農, [2]阪大産研, [3]微化研, [4]近畿大生物理工, [5]近畿大農)

3A15p04　二次代謝誘導ペプチド goadsporin の作用機構
14:33　○金田　彬[1], 尾崎太郎[1], 菅井佳宣[1], 浅水俊平[1], 千田俊哉[2], 尾仲宏康[1] ([1]東大院農, [2]高エネ研)

3A15p05　cyclo(L-Ala-L-Pro)のアフラトキシン生産阻害機構の解明
14:44　飯村九林[1], 古川智宏[1], 山本利義[1], 根岸瑠美[2], 鈴木道生[1], ○作田庄平[1] ([1]東大院農生科, [2]東大分生研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A15p06　オートファジー阻害剤テトランドリンの作用機序の解析
15:05　○宮前友策[1,2], 西藤有希奈[2], 臼井健郎[1], 増田誠司[2], 神戸大朋[2], 永尾雅哉[2] ([1]筑波大生命環境, [2]京大院生命)

3A15p07　インド産マンゴージンジャー根茎由来テルペン類の酵素阻害活性
15:16　○森本正則[1], 和田拓人[1], 星野麻耶[1], 吉岡百合[2], 松村晋一[2] ([1]近畿大農, [2]稲畑香料)

3A15p08　アミロイドβによる神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発
15:27　○水野美麗[1], 森　一憲[1], 中西郁夫[2], 松本謙一郎[2], 柴沼質子[1], 福原　潔[1] ([1]昭和大薬, [2]放医研)

3A15p09　α-GalNAc-ase 阻害剤のマクロファージ活性化タンパク質 GcMAF への影響
15:38　○蟹江善美, 前川侑也, 蟹江　治 (東海大工)

3A15p10　*Trichoderma* sp. USF-2690 の産生する sorbicillinoid 類及び bisorbicillinoid 類の抗炎症活性に関する研究
15:49　○高橋愛佳[1], 寺島健仁[1], 飯塚涼太[2], 國方真希[2], 菅谷紘一[2], 小野瀬淳一[2], 阿部尚樹[2] ([1]東農大院・食品栄養, [2]東農大・応生)

A16 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学，天然物化学—合成，反応機構—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A16a01　(+)-Salinipostin A の不斉合成研究
9:00　○藤岡孝亘, 森　直紀, 渡邉秀典 (東大院・農生科)

3A16a02　デリチアピロン A の生合成模倣合成
9:11　○倉沢一輝[1], 權　垠相[2], 桑原重文[1], 榎本　賢[1] ([1]東北大院農, [2]東北大院理)

3A16a03　ペスタロキノール A および B の合成研究
9:22　○小倉由資, 廣川高史, 陰山真将, 桑原重文 (東北大院・農生科)

3A16a04　抗トリパノソーマ活性を有する actinoallolide A の合成研究
9:33　○十和田諒, 桑原重文 (東北大院農)

3A16a05　クランベシン類縁体の合成研究
9:44　○毛利春輔, 中崎敦夫, 西川俊夫 (名大院生命農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A16a06　Hetiamacin 類の合成研究
10:05　○塚口頌悟, 十和田諒, 倉沢一輝, 小倉由資, 榎本　賢, 桑原重文 (東北大農)

3A16a07　ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A の右側部分の合成研究
10:16　○幸木謙典, 宮澤　悠, 駒田武馬, 安立昌篤, 西川俊夫 (名大院生命農)

3A16a08　分子内 Diels-Alder 反応を利用したステロイド骨格の新規構築法の開発
10:27　○渡邉正悟, 中崎敦夫, 西川俊夫 (名大院生命農)

3A16a09　Conosilane A の両鏡像体の全合成
10:38　○岡村仁則, 森　直紀, 渡邉秀典 (東大院・農生科)

3A16a10　Hymenoic acid 及びその類縁体の合成研究
10:49　○髙橋健輔, 久世雅樹, 滝川浩郷 (神戸大院・農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A16a11　新規反応を用いたオキシビニルグリシン類類縁体の全合成研究
11:10　○前田大輝, 堀之内妙子, 森　直紀, 渡邉秀典 (東大院・農・応生科)

3A16a12　抗植物病原菌活性を示す PseudohygrophoroneA[12] の合成研究
11:21 ○山本優月，渡邉秀典 （東大院農生科）
3A16a13　strophasterol C, D 及び glaucoposterol A の合成研究
11:32 ○佐藤俊太郎，福田裕紀，小倉由資，桑原重文 （東北大農）
3A16a14　三重結合を有するオキシリピン型天然物の全合成と構造の訂正
11:43 ○添田博樹，十和田諒，小倉由資，桑原重文 （東北大農）
3A16a15　(-)-isocelorbicol の合成研究
11:54 ○毛利朋世，高橋祐介，桑原重文，小倉由資 （東北大農）

A16 会場　午後の部（14:00〜16:00）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A16p01　ウコンより単離された芳香族ビサボラン型セスキテルペンの合成とその香気特性の解明
14:00 ○白川和泉[1]，矢島　新[2]，勝田　亮[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院・農，[2]東農大・生命）
3A16p02　JBIR-81 及び oryzamide A の合成
14:11 ○豊田麻実[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大生命）
3A16p03　有機合成化学的手法による ktedonobisether の幾何異性解明研究
14:22 ○齋藤克哉[1]，　春成円十朗[2]，　五十嵐康弘[2]，　桑原重文[1]，榎本　賢[1] （[1]東北大院農，[2]富山県立大工）
3A16p04　テトロドトキシンのフグ誘引活性の解明を目的とした類縁体の合成研究
14:33 ○中東亮太，安立昌篤，野口能寿，山本直之，阿部秀樹，西川俊夫 （名大院生命農）
3A16p05　テトロドトキシンの推定生合成中間体の合成研究
14:44 ○宮坂忠親[1]，安立昌篤[1]，杉本敬太[2]，山下まり[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]東北大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A16p06　Stereo-controlable *α*-amino aryl ketone formation: *α*-Amino *N*-hydroxysuccinimide ester derivatives as acyl donor for Friedel-Crafts acylation
15:05 ○Zetryana Puteri Tachrim，Yasuyuki Hashidoko，Makoto Hashimoto （Graduate School of Agriculture，Hokkaido University）
3A16p07　芳香族アミノ酸への光反応性基導入法の検討
15:16 ○橋本　誠，王　　磊，橋床泰之 （北大院農）
3A16p08　円偏光発光特性を示す光学活性オリゴナフトフランの簡便合成
15:27 ○倉持幸司[1]，片上千晶[2]，加茂翔伍[1,2]，谷口　透[3]，門出健次[3]，原　伸行[4]，　今井喜胤[4]，　椿　一典[2] （[1]東理大理工，[2]京府大院生命環境，[3]北大院先端生命，[4]近大院総合理工）
3A16p09　蛍光機能をもつ疎水性ベンジルアルコールの開発と液相ペプチド合成への応用
15:38 ○森川栄美，若松弘起，菅井正枝，岡田洋平，千葉一裕 （東農工大）
3A16p10　水素結合によって誘起されるベンズアルデヒド型蛍光色素
15:49 ○岡田洋平，菅井正枝，千葉一裕 （東農工大）

A17 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A17a01　フェナジノマイシン生合成におけるテルペン環化酵素の同定と機能解析
9:00 ○加藤輝仁，中尾智世，白石太郎，西山　真，葛山智久 （東大生物工学セ）
3A17a02　放線菌のメロテルペノイド生合成における普遍的脱アミノ化機構の解析
9:11 ○野口智弘，工藤　慧，西山　真，葛山智久 （東大・生物工学セ）
3A17a03　プレニルインドール化合物 carquinostatin A の生合成研究
9:22 ○小林正弥[1]，新家一男[2]，西山　真[1]，葛山智久[1] （[1]東大・生物工学セ，[2]産総研）
3A17a04　*Streptomyces griseus* IFO13350 におけるイミニマイシン類の生合成解析
9:33 ○堤　隼馬[1]，勝山陽平[1]，手塚武揚[1]，宮野　怜[2]，稲橋佑起[3]，高橋洋子[3]，中島琢自[3]，大西康夫[1] （[1]東大院農生科・応生工，[2]北里大・感染制御科学府，[3]北里大・北里生命科学研究所）
3A17a05　*Streptomyces* sp. IFM11307 由来芳香族ポリケタイド yoropyrazone 生合成経路の解析
9:44 勝山陽平[2]，○藤田夏澄[1]，當銘一文[3]，石橋正己[4]，大西康夫[2]（[1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生工，[3]富山大・和漢研，[4]千葉大院・薬）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A17a06　放線菌 *Streptomyces rochei* のシグナル分子生合成における P450 モノオキシゲナーゼの基質認識多様性の解析
10:05 ○手島愛子，波多江希，荒川賢治 （広島大院・先端研）
3A17a07　放線菌 *Streptomyces rochei* におけるキノン補酵素の構造および生合成の解析
10:16 ○原　圭佑，梅代亜紗子，荒川賢治 （広島大院・先端研）
3A17a08　Maniwamycin の生合成遺伝子クラスターの解析および生物活性
10:27 ○達川綾香[1]，岸本拓也[1]，福本　敦[2]，安齊洋次郎[2]，荒川賢治[1]（[1]広島大院・先端研，[2]東邦大・薬）
3A17a09　ゲノムマイニングにより見出した新規ホモポリアミノ酸の構造及びその生合成機構の解析
10:38 ○福本　響[1]，濱野吉十[2]，老川典夫[1]，山中一也[1] （[1]関西大・化生工，[2]福井県大・生物資源）
3A17a10　機能性低分子化合物のポリリジン化による生体膜透過性・水溶性の一挙改善
10:49 ○武内大和[1]，牛丸和乗[2]，加藤康夫[3]，丸山千登勢[1]，濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]産総研，[3]富山県大・生工研セ）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A17a11　JBIR-34, -35 の生合成を担う非リボソームペプチド合成酵素 FmoA3 の X 線結晶構造解析
11:10 ○曽根　薫[1]，原田彩佳[2]，勝山陽平[1]，千田美紀[2]，新家一男[3]，千田俊哉[2]，大西康夫[1] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]KEK，[3]AIST）
3A17a12　二次代謝特異的亜硝酸生合成経路により生合成される *Kutzneria albida* 由来新規天然物の探索
11:21 勝山陽平[2]，○山田研人[1]，大西康夫[2] （[1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生工）
3A17a13　組換え大腸菌を用いた flavonoid alkaloid の生産
11:32 ○大石和敬，川嶋智佳，谷美生夏，相澤光輝，長谷部文人，鮒　信学 （静県大食栄）

3A17a14　粘液細菌 *Sorangium cellulosum* 由来 1,8-DHN 合成酵素群の機能解析
11:43 ○曽根祐輔，中村修人，長谷部文人，金　承榮，鮒　信学（静県大食栄）

3A17a15　脂肪族ギ酸エステルの生合成に関わるコナダニ由来 Baeyer-Villiger 酸化酵素の探索
11:54 ○荒谷剛史[1]，森山太介[1]，森　直樹[2]，桑原保正[3]，清水伸泰[1]（[1]京都学園大バイオ環境，[2]京大院農・応用生命，[3]富山県大工・生工研セ）

A17 会場　午後の部（14:00〜14:44）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A17p01　Large-terpene 合成酵素の結晶構造解析
14:00 ○藤橋雅宏[1]，佐藤　努[2]，田中勇真[1]，山本大輔[1]，西　智之[2]，上田大次郎[2]，　村上瑞気[2]，　保野陽子[3]，　関原あい[3]，　福　和真[3]，品田哲郎[3]，三木邦夫[1]（[1]京大院理，[2]新潟大農，[3]阪市大院理）

3A17p02　Large-terpene 合成酵素の酵素的諸性質の解析と部位特異的変異
14:11 ○菅原　啓[1]，西　智之[1]，小川佳央[1]，高橋宏忠[1]，上田大次郎[1]，藤橋雅宏[2]，三木邦夫[2]，保野陽子[3]，品田哲郎[3]，佐藤　努[1]（[1]新潟大学，[2]京都大学，[3]大阪市立大学）

3A17p03　アセトニル基をもつノルイソプレノイド類の生合成：ビタミンKの非酵素的開裂
14:22 ○上田大次郎[1]，　松ヶ根沙織[1]，　岡本　渉[1]，　橋本昌征[2]，佐藤　努[1]（[1]新潟大学，[2]成功大分医所）

3A17p04　大腸菌内における C_{25} アーキア膜脂質生合成経路の構築
14:33 ○吉田　稜，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農）

A18 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A18a01　Calcarisporium arbuscular の生産する roridin 類について
9:00 ○松本愛美，橋本　勝（弘大）

3A18a02　マングローブ植物由来糸状菌 *Bionectria ochroleuca* B5-2 株が生産するりんごジュース米培地により誘導される二次代謝産物について
9:11 ○鈴木拓馬，網干貴子，村山哲也，小関卓也，塩野義人（山形大農）

3A18a03　微生物を用いたプロシアニジン分解・代謝物の機能性評価
9:22 ○北岡　望[1]，西村拓哉[1]，小堀　亮[1]，八上修一[1]，橋本誠也[2]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工・先端，[2]大阪電通大・工・環境）

3A18a04　*Paenibacillus* sp. PS-1 の生産するアフラトキシン生産阻害物質
9:33 ○楊　笑然[1]，古川智宏[1]，飯村九林[2]，高山誠司[1]，作田庄平[1]（[1]東大院農生科，[2]日女大家政）

3A18a05　アフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の引き起こす Clp プロテアーゼの異常活性
9:44 ○古川智宏[1]，片山秀和[2]，村瀬浩司[1]，根岸瑠美[3]，鈴木道生[1]，高山誠司[1]，作田庄平[1]（[1]東大院農生科，[2]東海大工，[3]東大分生研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A18a06　真菌資化性のグラム陰性細菌 *Collimonas fungivorans* Ter331 株が産生する不安定ポリイン類の構造決定と生物活性
10:05 ○甲斐建次，十亀麻衣（阪府大院・生命環境）

3A18a07　新規ペプタイボール acremopeptin に関する研究
10:16 ○飯島正富[1]，　雨宮昌秀[1]，　澤　竜一[1]，　久保田由美子[1]，国定孝雄[2]，百瀬　功[1]，川田　学[1]，柴崎正勝[1]（[1]微化研，[2]Meiji Seika ファルマ）

3A18a08　微生物二次代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索
10:27 ○森　菜月[1]，　深澤　航[1]，　岩月正人[1,2]，　野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，石山亜紀[1,2]，穂苅　玲[2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大学大学院感染制御科学府，[2]北里大学北里生命科学研究所）

3A18a09　薬剤感受性出芽酵母を用いた抗真菌薬シード化合物の探索
10:38 ○坂井克行[1]，廣瀬友靖[1,2]，岩月正人[1,2]，知念拓実[3]，木村　徹[1]，須賀拓弥[1,2]，　野中健一[1,2]，　中島琢自[1,2]，　砂塚敏明[1,2]，　臼井健郎[3]，浅見行弘[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]筑波大生命環境科学）

3A18a10　微生物の産生するアルベカシン耐性を克服する活性物質の探索
10:49 ○江口修平[1]，椎名真夕[1]，本庄雅子[2]，岩月正人[1,2]，浅見行弘[1,2]，垣内　力[3]，　松井秀仁[2]，　須賀拓弥[1,2]，　野中健一[1,2]，　松本厚子[1,2]，花木秀明[2]，砂塚敏明[2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研，[3]東大・院薬・免疫・微生物）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A18a11　新規スピロキシミシン類縁体 17T223A の構造と生物活性
11:10 ○菰田俊一[1]，鈴木眞依[1]，桑原　明[1]，武田　蛍[1]，竹中慶香[1]，山本　希[1]，小関良卓[2]（[1]宮城大　食産業，[2]東北大院　多元研）

3A18a12　LC/QTOF MS によるパリトキシン新規類縁体オストレオシン-A の微量迅速構造解析
11:21 ○寺島健仁[1]，内田秀明[2]，阿部尚樹[3]，安元　健[4]（[1]東農大院・食品栄養，[2]アジレント・テクノロジー，[3]東農大・応生，[4]日本食品分析センター）

3A18a13　Clavariopsins C-H, antifungal cyclic depsipeptides from an aquatic hyphomycete
11:32 ○Thin Wut SOE，Chunguang HAN，Yuki SAWAKI，Tomohiko TOMURA，Makoto OJIKA（Nagoya Univ.）

3A18a14　クロイソカイメン共生菌が生産する新規有毒二次代謝産物の構造決定
11:43 ○菊池　颯[1]，岡田華弥[1]，長由扶子[1]，吉田慎一朗[2]，權　垠相[2]，山下まり[1]，此木敬一[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院理）

3A18a15　Hfq が関わる RNA 代謝を標的とした新規薬剤の探索
11:54 ○高田綾子[1]，　和地正明[2]（[1]東工大・技術部，[2]東工大・生命理工学院）

A18 会場　午後の部（14:00〜16:00）

有機化学，天然物化学
―天然物 - 単離構造決定 - 微生物/天然物 - 単離構造決定 - 動物―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A18p01　New Isocoumarins, Naphthoquinones, and Cleistanthane Diterpene from *Nectria pseudotrichia* 120-1NP
14:00 ○Nanang Rudianto ARIEFTA[1,2]，Takako ABOSHI[2]，Tetsuya MURAYAMA[2]，Takuya KOSEKI[2]，Naoaki KURISAWA[3]，Ken-ichi KIMURA[1,3]，Yoshihito SHIONO[1,2]（[1]UGAS, Iwate University, [2]Faculty of Agriculture，Yamagata University，[3]Graduate School of Arts and Sciences，Iwate University）

3A18p02　Structural analysis of an antifungal substance from the endophyte Epichloë festucae
14:11 ○Enkhee Purev，Jennifer Niones，Hitomi Isobe，Rika Miura，Takushi Hashikawa，Tatsuhiko Kondo，Daigo Takemoto，Kazuhito Kawakita，Makoto Ojika（Nagoya University）

3A18p03　*Sphingobium yanoikuyae* EC-S001 株が産生する *Burkholderia plantarii* トロポロン生合成亢進因子の探索研究
14:22 ○能崎　薫，橋床泰之（北海道大学院農）

3A18p04　トリプトファン培地添加により生産誘導される放線菌化合物の同定
14:33 ○廣田万由子[1]，木谷　茂[1]，上田祥平[1]，池田治生[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]北里大・北里生命科学研究所）

3A18p05　Discovery of a new antibiotic-siderophore hybrid compound from combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*.
14:44　○Abrory Agus Cahya Pramana[1], Sungjin Kawai[2], Manami Kato[1], Shumpei Asamizu[1], Yoshinori Sugai[1], Hiroaki Suzuki[2], Yoshichika Arakawa[3], Hiroyasu Onaka[1]
([1]Univ. of Tokyo, [2]Toyota Boshoku, [3]Nagoya Univ.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A18p06　Fast and Effective Dereplication of Free Fatty Acids from Microbial Extracts in *Plasmodium falciparum* Malate: Quinone-Oxidoreductase Inhibitor Screening: The Effect of Alpha-Cyclodextrin Complexation
15:05　○Amila PRAMISANDI[1,2], Kazuyuki DOBASHI[3], Mihoko MORI[1,3], Daniel Ken INAOKA[4], Tomoyoshi NOZAKI[5], Satoshi OMURA[3], Kazuro SHIOMI[1,3]　([1]Graduate School of Infection Control Sciences. Kitasato University, Japan, [2]Laboratory for Biotechnology, BPPT, Indonesia, [3]Kitasato Institute for Life Sciences, Japan, [4]School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Japan, [5]Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Japan)

3A18p07　青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第 5 報)
15:16　○長谷川琢也[1],　岡部　淳[2],　加藤雄亮[2],　川出　洋[1,2],　夏目雅裕[1,2]　([1]東農工大・連農, [2]東農工大・院農)

3A18p08　ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化物質
15:27　○松井　翼, 平川祥成, 今井邦雄, 勝崎裕隆　(三重大院生資)

3A18p09　北アフリカ生息種サソリ(*Buthacus leptochelys*)の毒液に含まれる新規殺虫性ペプチドの探索
15:38　○義本裕介[1], Mohammed Abdel-Wahab[2], Moustafa Sarhan[2], 宮下正弘[1], 中川好秋[1], 宮川　恒[1]　([1]京都大学大学院農学研究科, [2]Al Azhar Univ.)

3A18p10　シキミグンバイ若虫分泌物に含まれる抗菌活性物質の探索
15:49　○高原千尋, 清水伸泰　(京都学園大院バイオ環境)

A19 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学, 天然物化学—天然物 - 単離構造決定 - 植物—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A19a01　マツリカ(*Jasminum sambac*, 花部)のアロマターゼ阻害活性成分
9:00　○井上尚樹[1],　二宮清文[1,2],　柴谷華苗[1],　佐々木佑人[1], 吉川雅之[1], 村岡　修[1,2], 森川敏生[1,2]　([1]近畿大・薬総研, [2]アンチエイジングセ)

3A19a02　タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部の新規プレニルクマリン成分とがん細胞増殖抑制活性
9:11　○杉田秀美[1],　二宮清文[1],　村木謙一[1],　佐伯竣介[1], Chaipech Saowanee[1,2], Pongpiriyadacha Yutana[2], 村岡　修[1], 森川敏生[1]　([1]近畿大・薬総研, [2]ラジャマンガラ工科大)

3A19a03　ローズヒップエキスおよび *trans*-tiliroside が肝細胞内脂質代謝におよぼす影響
9:22　○長友暁史[1,3],　二宮清文[1,2],　松本亜衣[1,3],　児玉高幸[3], 川上宏智[3], 吉川雅之[1], 村岡　修[1,2], 森川敏生[1,2]　([1]近畿大・薬総研, [2]近畿大・アンチエイジングセ, [3]森下仁丹)

3A19a04　釣藤鉤(*Uncaria rhynchophylla* 鉤部)由来トリテルペン成分の神経様突起伸長作用
9:33　○菅原　碧, 二宮清文, 河端千尋, 今野拓哉, 南野　享, 森川敏生　(近畿大・薬総研)

3A19a05　川芎(*Cnidium officinale*, 根茎)の糖代謝改善作用成分
9:44　○宮坂賢知, 二宮清文, 二宮　与, 酒井千恵, 塩谷美幸, 森川敏生　(近畿大・薬総研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A19a06　ツキヨタケ(*Omphalotus guepiniformis*)子実体に含まれるセスキテルペン類について
10:05　○青木聡樹, 網干貴子, 塩野義人, 村山哲也　(山形大学)

3A19a07　メノマンネングサ(*Sedum japonicum*)に含まれる新規フラボノイド配糖体について
10:16　○千葉恒太, 網干貴子, 塩野義人, 村山哲也　(山形大院農)

3A19a08　リンゴの傷害応答性トリテルペン類縁体の経時変化
10:27　○大畑勇統[1], 森田沙代[1], 吉永直子[1], 石栗陽一[2], 森　直樹[1]　([1]京大農, [2]青森産技セ　りんご研)

3A19a09　モモシンクイガに対する炭酸カルシウム水和剤の産卵阻害活性
10:38　○風間春奈[1], 高梨琢磨[2], 所　雅彦[2], 石栗陽一[3], 森　直樹[1], 吉永直子[1]　([1]京大院農, [2]森林総研, [3]青森産技セ　りんご研)

3A19a10　ブラジル バイーア州産プロポリス成分の構造解析と in vitro 抗がん活性
10:49　○光井太一, 堀田　翔, 田澤茂実, 加藤健司, 市原賢二　(アピ株式会社)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A19a11　β 複素環アラニン化合物によるエンドウ芽生えの重力屈性メカニズムの解明
11:10　○繁森英幸[1],　大宮由芽[2],　小出麻友美[2],　長谷川剛[2], 山田小須弥[1],　宮本健助[3],　上田純一[4],　長谷川宏司[1]　([1]筑波大生命環境, [2]筑波大院生命環境, [3]大阪府立大高等教育, [4]大阪府立大院理)

3A19a12　ヒト血清アルブミンの糖化を抑制するスパイス・ハーブの成分同定
11:21　○小堺瑞己,　ピピョーナイン,　盧　翌,　片山幸江, 鈴木道生, 永田宏次　(東京大農)

3A19a13　ポプラの根浸出物に含まれるストリゴラクトンの同定および構造解析
11:32　○下野　叡[1], 松下明真[1], 米山香織[2], 岡本昌憲[3], 野村崇人[1,3], 米山弘一[3],　謝　肖男[1,3]　([1]宇都宮大院・農, [2]愛媛大・農, [3]宇都宮大・バイオ)

3A19a14　New simple anti-ice nucleation assay
11:43　○Anugerah Adhi LAKSANA, Shingo SUZUKI, Keita ARAKAWA, Yukiharu FUKUSHI　(Hokkaido Univ.)

3A19a15　スリランカ産 *Spondias dulcis* 葉及び実に含まれる成分研究
11:54　○白井青海[1], 石丸幹二[1], 木村祐太[1], 染谷高士[2], Wijesekara R.G.S.[3], 渡邉啓一[1]　([1]佐賀大農, [2]アルビオン, [3]Wayamba Univ.)

A19 会場　午後の部(14:00〜15:16)

有機化学, 天然物化学—天然物 - 単離構造決定 - 植物—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A19p01　シモツケからのアルカロイドの探索と NGF 増強活性
14:00　○奥村祐太, 長島志栞, 小鹿　一　(名大院・生命農)

3A19p02　フキおよびツワブキ由来高純度ピロリジジンアルカロイド試薬の開発および安定性調査
14:11　○中塚宏志, 宮田健吾, 中塚進一　(長良サイエンス株式会社)

3A19p03　Analysis of flavonoid content in Oenothera's flower during senescence
14:22　○Yada TEPPABUT[1], Kin-ichi OYAMA[2], Tadao KONDO[1], Kumi YOSHIDA[1]　([1]Graduated School of Informatics, Nagoya University, [2]Research Institute for Materials Science, Nagoya University)

3A19p04　赤アズキ種皮に含まれる 2 種類の紫色色素の構造
14:33　○永井伸和[1]，数馬恒平[2]，尾山公一[3]，古賀和司[4]，橋本　勝[5]，近藤忠雄[2]，　吉田久美[2]　([1]名大情報科学，[2]名大情報学，[3]名大物国セ，[4]名大生命農学，[5]弘前大農生)

3A19p05　機能性フラバン-3-オール誘導体の効率的生産に向けた検討と生物活性評価
14:44　○小堀　亮[1]，西村拓哉[1]，宮形知美[2]，恒川昂平[2]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院・工・先端，[2]大阪電通大・工・環境，[3]立命館大・薬)

p06 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A19p06　ソテツリターからシアノバクテリアのホルモゴニア分化を誘導するビフラボン類の単離構造決定
15:05　○橋床泰之，西塚紘明　(北海道大学院農)

A20 会場　午前の部(9:00〜11:54)

生物科学―糖鎖科学 - 構造・機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A20a01　バクテリア由来 L-フコキナーゼ/GDP-L-フコースピロホスホリラーゼを用いた GDP-L-ガラクトースの高生産
9:00　○大橋博之[1]，WAHL Claudia[2]，大橋貴生[1]，ELLING Lothar[2]，　藤山和仁[1]　([1]大阪大学生物工学国際交流センター，[2]アーヘン工科大学)

3A20a02　講演取消

3A20a03　*Prevotella melaninogenica* 由来の糖タンパク質糖鎖遊離酵素の精製と性質およびその遺伝子発現系の構築と発現酵素の性質
9:22　竹内朋史，高谷尚弥，○伊藤和央　(阪市大院・理)

3A20a04　The role of *N*-linked glycosylation in the secretion and enzymatic stabilities of *Chamberlinius hualienensis* hydroxynitrile lyase expressed in *Pichia pastoris*
9:33　○Aem NUYLERT[1,2]，　Yasuhisa ASANO[1,2]　([1]Toyama Pref, Univ., [2]ERATO, JST)

3A20a05　ERp29 が媒介する小胞体内在レクチンシャペロンのダイマー形成
9:44　○中尾仁美[1]，瀬古　玲[2]，伊藤幸成[3]，迫野昌文[1]　([1]富山大院理工，[2]JST, ERATO，[3]理研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A20a06　精密分子プローブを用いたゴルジ体における新規 *N*-結合型糖鎖修飾プロセシング経路の解明
10:05　○三浦一輝[1]，　小野寺千尋[2]，　袴田　航[1,2]，　平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化)

3A20a07　小胞体グルコシダーゼ II 特異的蛍光基質の合成とヒト培養細胞での評価
10:16　○熊谷　理，袴田　航，平野貴子，西尾俊幸　(日大院生資科)

3A20a08　In vitro で発現した Glycoside Hydrolase Family 47 に属する蛋白における S-S 結合の形成
10:27　○相川順一，伊藤幸成　(理研)

3A20a09　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における *α*1,2-マンノシダーゼ欠損株の性状解析
10:38　○菊間隆志，相川順一，伊藤幸成　(理研)

3A20a10　N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをノックアウトした HBV 生産細胞の解析
10:49　○鈴木優矢，三崎　亮，岩崎将士，大橋貴生，藤山和仁　(大阪大 生工国際セ)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A20a11　フコース結合型糖鎖の合成に関わる酵素を失った CHO 細胞の解析
11:10　岩崎将士，　○三崎　亮，　大橋貴生，　藤山和仁　(大阪大生工国際セ)

3A20a12　ヒト細胞に発見した新規 *β*-ガラクトシダーゼの阻害剤探索と機能解明
11:21　○小野寺千尋[1]，　三浦一輝[2]，　袴田　航[1,2]，　平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科)

3A20a13　抗ウイルス剤を目指した多様な母核を有する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索
11:32　○恩田桃子[1]，東田彩花[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化)

3A20a14　非糖ミミックな構造を有するゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤のドラックリポジショニングスクリーニング
11:43　○小山亮祐，袴田　航，平野貴子，西尾俊幸　(日本大学大学院生物資源科学研究科)

A20 会場　午後の部(14:00〜14:55)

生物科学―糖鎖科学 - その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A20p01　マンゴー由来 *β*1,2-キシロース転移酵素遺伝子の同定・機能解析
14:00　○岡田貴裕，池田義孝　(佐賀大医)

3A20p02　ニワトリ CD69 のグルカン結合活性
14:11　○佐々木理恵[1]，　武藤愛里[2]，　安藤　郷[2]，　西脇多恵子[1]，木落信郎[2]，伊藤成美[1]，澤　桃子[1]，奥村裕紀[1,2]，氏田　稔[1,2]　([1]名城大農，[2]名城大院農)

3A20p03　超長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ糖脂質類を用いた糖鎖認識抗体の開発
14:22　○奥田徹哉　(産総研生物プロセス)

3A20p04　プロテオグリカンを改変することによる生体機能への有効性に対する増強効果
14:33　○佐野栄宏[1]，商　　怡[1]，安保亜衣子[1]，山口信哉[1]，中根明夫[2]，齋藤知明[1]　([1]青森産技，[2]弘前大医)

3A20p05　*Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 株が生産する高粘性細胞外多糖の物性および構造解析
14:44　○福田健二[1]，池田新矢[2]，村山大樹[1,2]，鶴巻　茜[1]，佐藤翔野[1]，浦島　匡[1]　([1]帯畜大生命・食料，[2]ウィスコンシン大)

A21 会場　午前の部(9:00〜12:05)

生物科学―生物工学 - 酵素工学・生物反応工学―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A21a01　Ecobody 法によるウサギモノクローナル抗体取得法の開発
9:00　○新海佑介[1]，森下しおみ[1]，加藤晃代[2]，兒島孝明[1]，中野秀雄[1]　([1]名大院　生命農，[2]名城大農)

3A21a02　Ecobody 法によるヒトシングル B 細胞由来抗インフルエンザモノクローナル抗体の取得と大腸菌による大量発現
9:11　○小森有華[1]，加藤晃代[2]，兒島孝明[1]，中野秀雄[1]　([1]名大院生命農，[2]名城大農)

3A21a03　The production and characterization of Fab antibody fused with *Escherichia coli* alkaline phosphatase expressed in *Escherichia coli* oxidative cytoplasm
9:22　○Panwad RITTHISAN[1]，Teruyo OJIMA-KATO[1,2]，Jasmina DAMNJANOVIC[1]，Takaaki KOJIMA[1]，Hideo NAKANO[1]　([1]Laboratory of Molecular Biotechnology，Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University，[2]Knowledge Hub Aichi，Aichi Science and Technology Foundation)

3A21a04　二種非天然型アミノ酸同時導入による高機能化タンパク質生産
9:33　○大竹和正[1]，春名健一[2]，坂本健作[1]（[1]理化学研究所　ライフサイエンス技術基盤研究センター，　[2]味の素株式会社 イノベーション研究所）

3A21a05　無細胞タンパク質合成系における DNA 結合タンパク質 TALE を用いた遺伝子発現制御
9:44　○早川涼人，迫野昌文（富大院理工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A21a06　デザイナーリボソーム構築に向けた試み
10:05　○森めぐみ[1]，宮脇佑実[1]，油屋駿介[1,2]，青木　航[1,3]，植田充美[1,3]（[1]京大院・農　応用生命，[2]日本学術振興会（DC[1]），[3]京都バイオ計測センター）

3A21a07　タンパク質進化を潜在的に支配する安定性
10:16　○倉橋　亮[1]，田中俊一[2]，佐野　智[1]，松村浩由[3]，高野和文[1]（[1]京府大院生命環境，[2]立命大R-GIRO，[3]立命大生科）

3A21a08　大腸菌を宿主とした可溶性発現における α-ヘリックス構造の親水性・疎水性領域の重要性
10:27　○篠田　優[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

3A21a09　メタンモノオキシゲナーゼホモログ発現に関連する GroEL 様タンパク質の単離と特性評価
10:38　○井上千裕，安部欣高，藤枝伸宇（阪府大・生命環境）

3A21a10　可溶性メタンモノオキシゲナーゼホモログの異種発現系の構築
10:49　○安部欣高，井上千裕，藤枝伸宇（阪府大・生命環境）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A21a11　*Ruminiclostridium josui* 由来のアラビノフラノシダーゼとアセチルキシランエステラーゼの両触媒ドメインを持つ新規な酵素 Abf62A-Axe6A の酵素特性およびヘミセルラーゼ複合体の活性
11:10　○汪　亜運，粟冠真紀子，國武絵美，木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生資）

3A21a12　芳香族アミノ基酸化酵素の位置選択性改変系の構築
11:21　○冨田宏矢[1,2]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]JST, CREST）

3A21a13　Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by combining various mutations
11:32　○Misato BABA[1]，Ryota KAKUE[1]，Christoph LEUCHT[2]，Peter RASOR[2]，Heiko WALCH[2]，Daniel LADIGES[2]，Christian BELL[2]，Kenji KOJIMA[1]，Teisuke TAKITA[1]，Kiyoshi YASUKAWA[1]（[1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.，[2]Roche Diagnostics GmbH）

3A21a14　放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの活性三残基，アスパラギン酸の変異体はアルコリシス活性を亢進する
11:43　○裏地美杉，東海彰太，畑中唯史（岡山生物研）

3A21a15　*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼによるアミノ酸のアセチル化反応におけるキラル認識
11:54　○井上　尚[1]，吉田知博[2]，佐伯　將[2]，美藤友博[2]，清水克彦[3]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農，[3]鳥取大産学）

A21 会場　午後の部（14:00〜15:38）

生物科学―生物工学 - 酵素工学・生物反応工学―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A21p01　大腸菌ゲノムに遺伝子導入された人工的な代謝酵素複合体によるクルクミンの生産
14:00　○吉越健輔[1]，石澤崇昭[1]，篠田　優[1]，平野勝紹[1]，鮒　信学[2]，春木　満[1]，平野展考[1]（[1]日大・工，[2]静岡県立大・栄養・食品生命科学）

3A21p02　ラン藻由来アシル ACP 還元酵素の変異解析による炭化水素合成量の向上
14:11　○工藤　恒，林　勇樹，新井宗仁（東大・総合文化・生命）

3A21p03　進化分子工学によるフィチン酸加水分解酵素の低温活性向上
14:22　○和田愛未，林　勇樹，新井宗仁（東大・総合文化・生命環境）

3A21p04　*Arthrobacter* sp.KI72 におけるナイロンモノマー代謝に関する遺伝子クローニングと代謝経路の同定
14:33　○藤井　翼[1]，竹原一起[1]，橋本　悠[1]，加藤太一郎[2]，武尾正弘[1]，根来誠司[1]（[1]兵庫県大・院工・応化，[2]鹿児島大・理）

3A21p05　エチレングリコール中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能相関
14:44　○岡崎秀明，生越大輔，戸田　光，麦田悠紀，竹原一起，武尾正弘，根来誠司（兵庫県立大学大学院）

p06〜p08 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A21p06　プトレッシンオキシダーゼと発色試薬を用いたプトレッシンの新規簡易定量法の開発
15:05　○太田宏一，杉山友太，栗原　新（石川県大生資環）

3A21p07　1-オクタノール／緩衝液二相系におけるチロシナーゼを用いたテアフラビン-3-ガレートの効率的合成
15:16　○奈良井朝子，中山　勉（日獣大・応生科）

3A21p08　*Burkholderia* 属細菌 Para-1 株由来アセチルコリンエステラーゼの Cys 残基置換の影響-有機リン系農薬検出系への応用を目指して-
15:27　○藤本拓也[1]，北村智彬[1]，泊　直宏[2]，山本佳宏[2]，鶴岡直樹[3]，茂里　康[3]，渡部邦彦[1]（[1]京府大院生命環境，[2]京産技研，[3]産総研）

A22 会場　午前の部（9:00〜11:21）

生物科学―生物工学 - 生物材料工学，生体医用工学/生物工学 - その他

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A22a01　鉄酸化細菌を利用したジルコニウム含有ベンガラの作製
9:00　○田村勝徳[1,2]，　中西　真[1]，　久能　樹[1,2]，　久能　均[1,2]，高田　潤[1,2]（[1]岡大院自科，[2]CREST）

3A22a02　DNA アプタマーを整列固定化するバイオナノカプセル足場分子の開発
9:11　○山田裕紀，飯嶋益巳，黒田俊一（大阪大学）

3A22a03　金ナノ粒子ー磁性ナノ粒子クラスターを用いたノロウイルスの分離・濃縮による高感度検出
9:22　○竹村謙信[1]，　リージャエウォーク[2]，　オルワセサンアデゴケ[2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化，　[2]静大・グリーン科技研）

3A22a04　ミミズ *Eisenia fetida* で構築した遺伝子導入法の応用可能性の検討及びミミズによるバイオ医薬品生産の試み
9:33　○山谷竜大，竹内　綾，町田　悠，土田喜野，赤澤真一（長岡高専物質工）

3A22a05　生物のセキュリティーホールを攻撃する人工遺伝子
9:44　○小林英城（海洋機構）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A22a06　高感度コリン応答型遺伝子スイッチの開発
10:05 ○小林一幾，星野孝幸，鈴木紳一郎，河合(野間)繁子，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

3A22a07　カイコーバクミド遺伝子発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫に対するワクチン開発の基盤構築
10:16 ○稲垣　裕[1]，林谷美貴子[2]，宮崎剛亜[1,3]，デオヴィピンクマル[4]，Murhandarwati Elsa Heridiana[5]，加藤竜也[1,2,3]，朴　龍洙[1,2,3]（[1]静大院・総科技・農，[2]静大・農・応生化，[3]静大グリーン科技研，[4]静大　グローバル，[5]ガジャマダ大学）

3A22a08　Expression of Structural Protein of Dengue Virus serotype 3 using Silkworm Expression System
10:27 ○Doddy Irawan Setyo UTOMO[1]，Fithriyah SJATHA[2]，Tatsuya KATO[1,3]，Enock Y. PARK[1,3]（[1]Lab. Biotech, Dept. Agric., Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.，[2]Dept. Microbiol, Fac. Med., Univ. Indonesia.，[3]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

3A22a09　抗体医薬開発に向けたニワトリ由来モノクローナル抗体のヒト化
10:38 ○坂田知子，庄屋雄二，粟田ちひろ，坂下真耶，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

3A22a10　カイコを用いたデングウイルス 2 型由来構造タンパク質の発現
10:49 ○市川博野[1]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・総科技・農，[2]静大グリーン科技研）

a11 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A22a11　Expression of recombinant *Neospora caninum* profilin in *Bombyx mori*
11:10 ○Hamizah Suhaimi[1]，Rikito Hiramatsu[2]，Tatsuya Kato[1,2,3]，Enoch Y. Park[1,2,3]（[1]Lab. Biotechnol, Dept. Biosci, Grad School. Sci. Technol, Shizuoka Univ.，[2]Lab. Biotechnol, Dept. Appl. Biol. Chem, Coll. Agric, Grad School. Integ. Sci. Technol, Shizuoka Univ.，[3]Lab. Biotechnol, Res Inst. Gn Sci. Technol, Shizuoka Univ.）

A23 会場　午前の部(9:00〜12:05)

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御/細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A23a01　皮膚のメラニン形成における制御性 T 細胞の機能に関する研究
9:00 ○青木梨紗[1]，鵜浦由里奈[1]，野口真行[1]，増澤(尾﨑)依[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大・生資科・生命化，[2]日大院・生資科・応用科）

3A23a02　飢餓が皮膚中ヒアルロン酸合成に及ぼす影響
9:11 ○山根拓実，金野凌介，岩槻　健，大石祐一（東農大応生科）

3A23a03　ショウジョウバエの高糖耐性に関する比較遺伝学的解析
9:22 ○阿部真生子[1]，渡辺佳織[2]，服部佑佳子[2]，上村　匡[2,3]，丹羽隆介[1,3]（[1]筑波大生物，[2]京都大院生命科学，[3]AMED-CREST）

3A23a04　Mutational and Biochemical analysis of the dual kinase region of UNC-89（OBSCURIN）
9:33 ○Youhei MATSUNAGA，Guy BENIAN（Emory Univ.）

3A23a05　アギトアリ毒液成分の網羅的解析
9:44 ○稲垣英利[1]，数馬恒平[2]，紺野勝弘[3]，増子恵一[4]（[1]産総研バイオメディカル，[2]名大院情報，[3]富山大和漢，[4]専修大学経営）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A23a06　アンドロゲンによる細胞骨格制御は，外生殖器の性差形成に不可欠である
10:05 ○鈴木堅太郎，アセベドアルビン，山田　源（和歌山県立医大）

3A23a07　ClpXP によるミトコンドリア DNA 遺伝子発現制御の解析
10:16 ○松島雄一[1]，廣藤雄太[1,2]，康　東天[1]（[1]九州大医，[2]九州大歯）

3A23a08　ホスファチジルイノシトール定量法の新規開発と細胞内主要リン脂質クラスの定量的解析
10:27 ○辻　徳治[1]，森田真也[1,2]，池田義人[1]，寺田智祐[1]（[1]滋賀医大・病院薬，[2]AMED-PRIME）

3A23a09　ホスファチジルイノシトール 4-リン酸によるオートファジーの制御
10:38 ○石川遥菜，伊藤昭博，前本佑樹（東京薬大・生命）

3A23a10　リサイクリング経路におけるリン脂質分解酵素 PA-PLA1 の機能解析
10:49 ○本橋愛依，前本佑樹，根本和彰，伊藤昭博（東京薬大・生命）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A23a11　ホスファチジルセリンを介してリサイクリングエンドソームに局在する低分子量 G タンパク質 Rab の機能解析
11:10 ○國田凌輝，森　昌人，大橋貴生，藤山和仁，三崎　亮（大阪大・生物工学国際交流センター）

3A23a12　低分子量 GTPase Rab11 に対する新規 GDP/GTP 交換因子(GEF)である SH3BP5 および SH3BP5L の哺乳類細胞における生理機能の解析
11:21 ○諸岡信克，佐藤美由紀，佐藤　健（群馬大生調研）

3A23a13　線虫 C.elegans R13A5.9 の腸における機能
11:32 ○田村耕太，辻　俊祐，坂田和実，小栗栖太郎（岩手大学）

3A23a14　線虫 *C.elegans* R13A5.9 変異体へのマウスホモログ導入の効果
11:43 ○昆野　諒，小栖栗太郎，坂田和実（岩手大学）

3A23a15　細胞骨格 β アクチンの C 末端側断片によるアポトーシス誘導機構の解析
11:54 ○伊東奈那子[1]，田中眞人[1,2]（[1]東京電機大・院・生命理工，[2]東京電機大・理工）

A23 会場　午後の部(14:00〜16:00)

動物―細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A23p01　核内 mRNA 代謝阻害活性を持つ化合物の探索とその分子基盤の解析
14:00 ○三宅俊太郎，西野勝俊，神戸大朋，永尾雅哉，増田誠司（京大院生命）

3A23p02　小胞体の COPII 小胞出芽領域におけるカルシウム・イメージングとカルシウムチャネルの探索
14:11 ○松下明理[1]，高橋維朝[2]，林本敬大[2]，高原照直[2]，柴田秀樹[2]，牧　正敏[2]（[1]名大農・応生科，[2]名大院・生命農）

3A23p03　COP2 結合タンパク質である Sec16B の新機能の解明
14:22 ○保阪拓利，小林俊木，前本佑樹，伊藤昭博（東京薬科大学）

3A23p04　mTOR シグナルによる SREBP 活性化機序の解析
14:33 ○山内祥生[1,2]，古川鋼一[2,3]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大農，[2]名大医，[3]中部大）

3A23p05　内因性酸化コレステロールが SREBP-2 活性に及ぼす影響
14:44 ○齋藤穂高，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A23p06　脂質トランスポーター ABCA1 と α1-syntrophin および α-TTP 間の相互作用機構の解析
15:05　○梶友里恵[1,2], 谷口詩保[2], 藤林果奈[2], 杉本直紀[2], 佐伯和弘[1,2], 田口善智[1,2]　([1]近畿大院 生物理工, [2]近畿大 生物理工 遺伝子)

3A23p07　脂質トランスポーター ABCA1 は膜脂質を動かすことによって細胞遊走を制御する
15:16　○伊藤志帆[1], 木岡紀幸[1], 植田和光[1,2]　([1]京大院農, [2]京大 iCeMS)

3A23p08　酸化コレステロール結合タンパク質 Insig1/2 による ATF4 発現亢進機構の解明
15:27　○渡邉雄一, 三吉翔子, 清水　誠, 井上　順, 佐藤隆一郎 (東大院・農生科・応生化)

3A23p09　SREBP/SCAP 相互作用を介する新規脂質合成制御因子の探索
15:38　○丸山貴史, 官　彦州, 清水　誠, 井上　順, 佐藤隆一郎 (東大院農生科・応生化)

3A23p10　超音波処理を用いた接着斑単離法の確立
15:49　○柴原正和[1], 箕浦広大[2], 市川尚文[2], 木村泰久[2], 植田和光[2,3], 木岡紀幸[2]　([1]京大農, [2]京大院農, [3]京大iCeMS)

A24 会場　午前の部(9:00〜12:05)

動物―タンパク質 - 構造, 機能, 活性, 修飾, 分解, 局在, プロテオーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A24a01　血液凝固因子トロンビンのメダカにおける類似遺伝子産物の発現解析
9:00　○鈴木里沙[1,2], 渡邊優子[2], 奥谷冬穂[2], 辰川英樹[1,2], 橋本寿史[3], 人見清隆[1,2]　([1]名大農, [2]名大院創薬科学, [3]名大生物機能開発利用セ)

3A24a02　ヒト表皮細胞分化に伴うタンパク質架橋酵素の発現変動と基質探索
9:11　○加藤まなみ[1,2], 田辺勇輝[2], 辰川英樹[1,2], 人見清隆[1,2]　([1]名大農, [2]名大院創薬科学)

3A24a03　ABCA1 による HDL 産生活性は細胞膜コレステロール濃度に依存している
9:22　○小笠原史彦[1], 木村泰久[1], 植田和光[1,2]　([1]京大院農・応用生命科学, [2]京大・iCeMS)

3A24a04　キメラタンパク質を用いた ABCA サブファミリータンパク質の C 末端領域の機能解析
9:33　○岡本雄介[1], 永田　紘[2], 笠井倫志[3], 木村泰久[1], 木岡紀幸[1,2], 植田和光[1,2]　([1]京大院・農, [2]京大iCeMS, [3]京大ウイルス・再生医科学研究所)

3A24a05　リン脂質輸送体 ABCB4 の基質取り込みゲートの解析
9:44　○小川　峻[1], 末永健人[1], 木岡紀幸[1], 木村泰久[1], 植田和光[1,2]　([1]京大農応生, [2]京大iCeMS)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A24a06　ヒト多剤排出ポンプ MDR1(ABCB1)の構造変化において ATP が果たす役割の検討
10:05　○二股良太[1], 小笠原史彦[1], 市川尚文[1], 木村泰久[1], 木岡紀幸[1], 植田和光[1,2]　([1]京大院農, [2]京大・iCeMS)

3A24a07　光反応性ホスファチジルコリンを用いた脂質抱合型 apoA-I の標識手法の確立
10:16　○藤本和希[1], 木村泰久[1], 安部真人[1], 三芳秀人[1], 植田和光[1,2]　([1]京大院・農・応用生命, [2]京大・物質-細胞統合システム拠点)

3A24a08　Phos-tag SDS-PAGE を用いた N-ミリストイル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解析
10:27　○谷川綾音[1], 木下恵美子[2], 黄波戸亜哉[1], 守屋康子[1], 木下英司[2], 小池　透[2], 内海俊彦[1]　([1]山口大院・創成科, [2]広島大院・医歯薬保)

3A24a09　精製タグや IPTG 誘導を利用しない熱不安定な蛋白質の調製
10:38　○小林　誠[1], 西川勇樹[1], 田中真帆[1], 恩田真紀[2]　([1]大阪府大・生命環境・自然科学, [2]大阪府大院・理・生物)

3A24a10　アミロイドプラーク分解促進薬開発を目的とした tPA プロテアーゼドメインの調製
10:49　○津田美代子[1], 原田彰大[2], 加藤美有[2], 恩田真紀[1]　([1]大阪府大院・理・生物, [2]大阪府大・生命環境・自然科学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A24a11　亜鉛要求性エクト型酵素 ALP の局在の違いに着目した活性化機構の解析
11:10　○松永麻佑, 神戸大朋　(京都大生命)

3A24a12　哺乳類 II 型膜タンパク質の細胞内局在化における膜貫通領域の役割
11:21　○亀卦川樹, 越中谷賢治, 向井有理　(明大院・理工・電気)

3A24a13　アポトーシス促進蛋白質 CDIP1 に対する ALG-2 のカルシウム依存的アダプター機能の解析
11:32　○森可奈子[1], 犬飼隆太[2], 高原照直[2], 柴田秀樹[2], 牧　正敏[2]　([1]名大農・応生科, [2]名大院・生命農)

3A24a14　ストア作動性 Ca^{2+} 流入調節因子 SARAF の翻訳後修飾における ALG-2 の役割
11:43　○村松彩夏[1], 張　　維[2], 寺西直樹[2], 高原照直[2], 柴田秀樹[2], 牧　正敏[2]　([1]名大農・応生科, [2]名大院・生命農)

3A24a15　翻訳後修飾による紫外線損傷 DNA 認識タンパク DDB2 の制御
11:54　○荒川和彦, 萩原遥太, 小川大輝, 金岡英徳, 西島謙一, 飯島信司　(名大院・工　生命分子工)

A24 会場　午後の部(14:00〜16:00)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A24p01　2 種類のマウスほ乳類キチナーゼのキチナーゼ活性比較
14:00　○木村将大, 梅山隆敏, 脇田悟誌, 大川一明, 坂口政吉, 小山文隆　(工学院大先進)

3A24p02　ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの nonsynonymous SNPs による活性の調節
14:11　○小山文隆, 大野美紗, 樫村昭徳, 木村将大, 坂口政吉, 菅原康里, 大川一明　(工学院大学先進工学部)

3A24p03　ニワトリ酸性キチナーゼの消化酵素としての機能解析
14:22　○田畑絵理, 樫村昭徳, 脇田悟誌, 大野美紗, 坂口政吉, 菅原康里, 小山文隆　(工学院大先進工)

3A24p04　二枚貝稜柱層における結晶欠陥形成因子の比較
14:33　○近都浩之[1], 奥村大河[2], 根岸瑠美[3], 永田宏次[1], 小暮敏博[2], 作田庄平[1], 鈴木道生[1]　([1]東大院農, [2]東大院理, [3]東大分生研)

3A24p05　アセチル化模倣型変異体を用いた IDH2 の活性調節機構の構造学的解析
14:44　○徐　玉群[1], 宮川拓也[1], 劉凌ウェン[1], 中村　顕[1], 染谷慎一[2], 田之倉優[1]　([1]東大院・農生科, [2]フロリダ大・医・加齢研究科)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A24p06　腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の糖鎖認識機能解析
15:05　○柳田智代, 磯野麻依, 渡辺寛人　(明治大農)

3A24p07　ビタミン B6 は糖化タンパク質受容体 RAGE に結合する
15:16　○村上庸人[1], 倉知遼太郎[1], 三宅春奈[1], 藤本汐莉[1], 臼井照幸[2], 早瀬文孝[1], 渡辺寛人[1]　([1]明治大農, [2]女子栄養大)

3A24p08　S-チオール化血清アルブミンによる炎症誘導機構の解明
15:27　○中島史恵[1], 柴田貴広[1], 菊地良介[2], 松下　正[2], 内田浩二[3]　([1]名大院・生命農, [2]名大院・医, [3]東大院・農学生命)

3A24p09　線虫 *C. elegans* の活性酸素感受性突然変異体の解析
15:38　○高梨朱央[1]，　齋藤優樹[1]，　高氏裕貴[1,2]，　三木健輔[1,2]，鮎澤　大[1,2]，　藤井道彦[1]　([1]横市大生命ナノシステム，[2]イチバンライフ㈱)

3A24p10　出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae を用いた 5-ブロモデオキシウリジン作用機構の解明
15:49　○堤　杏子[1]，　圓　敦貴[1]，　高氏裕貴[1,2]，　三木健輔[1,2]，鮎澤　大[1,2]，藤井道彦[1]　([1]横浜市立大学，[2]イチバンライフ㈱)

A25 会場　午前の部(9:00〜12:05)

酵素―タンパク質・ペプチド代謝関連酵素/アミノ酸代謝関連酵素

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A25a01　アミノペプチダーゼ B の基質特異性解析
9:00　○大西　敦，辻本雅文　(帝京平成大薬)

3A25a02　*Grimontia hollisae* および *Clostridium* 属コラゲナーゼの比較研究：酵素活性への緩衝液と塩の影響と反応機構への洞察
9:11　○滝田禎亮[1]，銭　　鈞[1]，耿　紅敏[1]，何　澤剣[1]，根本　翔[1]，森真璃子[1]，田中啓友[2]，服部俊治[2]，兒島憲二[1]，保川　清[1]　([1]京都大農，[2]株式会社ニッピ)

3A25a03　植物病原菌エフェクター RipAY の宿主チオレドキシン依存的な活性化機構の解析
9:22　○藤原祥子，池尻篤生，田中直孝，田淵光昭　(香川大学)

3A25a04　*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の基質認識機構の解明
9:33　○中村彰宏[1]，本間宣行[1]，六本木沙織[2]，鈴木義之[1]，志田洋介[1]，阪本泰光[2]，飯塚一平[2]，伊中浩治[3]，田仲広明[4]，木平清人[5]，山田　貢[5]，吉崎　泉[5]，合田浩明[6]，野中孝昌[2]，田中信忠[6]，小笠原渉[1]　([1]長岡技科大，[2]岩手医科大，[3]丸和栄養食品，[4]コンフォーカルサイエンス，[5]宇宙航空研究開発機構，[6]昭和大)

3A25a05　部位特異的変異導入解析による Family S46 ペプチダーゼの基質認識残基の同定
9:44　○本間宣行[1]，中村彰宏[1]，六本木沙織[2]，鈴木義之[1]，志田洋介[1]，阪本泰光[2]，飯塚一平[2]，伊中浩治[3]，田仲広明[4]，木平清人[5]，山田　貢[5]，吉崎　泉[5]，合田浩明[6]，野中孝昌[2]，田中信忠[6]，小笠原渉[1]　([1]長岡技科大，[2]岩手医科大，[3]丸和栄養食品，[4]コンフォーカルサイエンス，[5]宇宙航空研究開発機構，[6]昭和大)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A25a06　*Pimelobacter* 由来 metzincin メタルプロテアーゼの構造と機能
10:05　○大橋大志[1]，浴野圭輔[2]，尾山　廣[1]　([1]摂南大理工，[2]崇城大生物生命)

3A25a07　*Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの反応特性に関わるアミノ酸残基の機能解析
10:16　○若山　守[1]，佐野千晴[1]，日幷隆雄[2]，伊藤貴文[2]，林　順司[1]　([1]立命館大学，[2]福井県立大学)

3A25a08　*Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼ反応特性の構造生物学的解析
10:27　○日ビ隆雄[1]，若山　守[2]，佐野千晴[2]，伊藤貴文[1]，林　順司[2]　([1]福井県大生資，[2]立命大理工)

3A25a09　新規単量体型 L-スレオニン脱水酵素の発見と生成物脱離機構の解明
10:38　○本山智晴[1]，中野祥吾[1,4]，山本雄大[3]，常盤広明[3]，浅野泰久[2,4]，伊藤創平[1,4]　([1]静岡県大・薬食・食栄，[2]富山県大・工・生工研セ，[3]立教大・理，[4]JST, ERATO)

3A25a10　祖先型設計法を用いた L-アルギニン酸化酵素の基質特異性の改変と熱安定化
10:49　○丹羽正純[1]，　中野祥吾[1,3]，　浅野泰久[2,3]，　伊藤創平[1,3]　([1]静岡県大・食栄，[2]富山県大・工・生工研セ，[3]JST. ERATO)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A25a11　緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼにおける H216 の役割
11:10　○菅野裕司[1]，平戸祐喜[2]，後藤　勝[3]，小池美弥[1]，谷川　実[1]，西村克史[1,2]　([1]日大理工，[2]日大短大，[3]東邦理)

3A25a12　植物疫病菌由来 NAD(P)$^+$ 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能・構造解析
11:21　○米田一成[1]，櫻庭春彦[2]，荒木朋洋[1]，大島敏久[3]　([1]東海大・農・バイオ，[2]香川大・農・応用生物科学，[3]大阪工大・工・生命)

3A25a13　高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した新規 L-アルギニンオキシダーゼの構造解析と新たな基質特異性改変酵素について
11:32　○松尾慎作[1]，北川征樹[2]，今田勝巳[2]，日下部均[3]，根本理子[1]，田村　隆[1]，稲垣賢二[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]阪大院・理，[3]㈱エンザイム・センサ)

3A25a14　好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株の D-アミノ酸オキシダーゼの酵素学的諸特性解析
11:43　○七五三掛湧也，　高橋祥司，　阿部勝正，　解良芳夫　(長岡技科大・生物)

3A25a15　*Thermus thermophilus* の有する新規セリン生合成酵素の同定と性状解析
11:54　○千葉洋子[1]，島村　繁[1]，吉田彩子[2]，西山　真[2]，高井　研[1]　([1]海洋研究開発機構，[2]東大生工セ)

A25 会場　午後の部(14:00〜15:38)

酵素―アミノ酸代謝関連酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A25p01　D-アミノ酸合成酵素のファンクショナルスクリーニング系の開発
14:00　○武藤菜摘，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹　(名大院生命農)

3A25p02　D-セリンデヒドラターゼの基質となるヒト尿中未知アミノ酸の同定
14:11　○戸野真由香，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹　(名大院生命農)

3A25p03　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* のホモクエン酸合成酵素の構造・機能及びフィードバック阻害機構の解析
14:22　○鈴木智大，富田武郎，葛山智久，西山　真　(東大生セ)

3A25p04　D-リジン異化代謝オペロン転写因子 DlcR の分子機構の解析
14:33　○黒石和樹，太田昌希，佐藤大起，戸部隆太，三原久明　(立命館大)

3A25p05　*E. coli* ビタミン B_6 結合タンパク質 YggS と *glyA* との合成致死性の要因
14:44　○堀　　蘭，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹　(名古屋大生命農)

p06〜p08 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A25p06　*Geobacillus kaustophilus* 由来ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素の機能解析
15:05　○大森勇門[1]，張　世文[1]，米田一成[2]，大島敏久[1]　([1]大阪工大工，[2]東海大農)

3A25p07　*Pseudomonas fluorescens* SBW25 株のピラジン生合成経路
15:16　○桝尾俊介，生井智仁，津田祐介，高谷直樹　(筑波大生命環境系)

3A25p08　L-メチオニン γ-リアーゼから作成した基質特異性改変酵素の性質と構造解析
15:27　○半田暖尚[1], 安田江里[1], 室田昌輝[2], 湯之戸俊介[2], 佐藤　暖[2], 志波智生[2],　原田繁春[2],　田村　隆[1],　稲垣賢二[1]　([1]岡山大院・環境生命, [2]京工繊大院・工芸科学)

A26 会場　午前の部(9:00〜11:54)

酵素―糖質代謝関連酵素/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A26a01　イネ由来 α-アミラーゼの触媒反応機構に対する構造的洞察
9:00　○落合秋人, 菅井　寛, 田中孝明, 谷口正之, 三ツ井敏明(新潟大・自然研)

3A26a02　非凍結結晶を用いた β-アミラーゼ(E380A)と基質との複合体の pH 変化の解析
9:11　○三上文三[1], 安達基泰[2], 姜　有那[1], 水谷公彦[1], 高橋延行[1]([1]京大農, [2]日本原子力機構)

3A26a03　*Paenibacillus polymyxa* 由来 β-アミラーゼの Ser161 および Trp175 の機能解析
9:22　○肥垣津雄日[1], 多田俊治[2], 炭谷順一[1], 川口剛司[1], 乾　隆[1], 西村重徳[1]　([1]阪府大院・生環科, [2]阪府大院・理)

3A26a04　ミミズが有する血栓分解酵素及び各種糖質加水分解酵素の発現条件の検討
9:33　○櫻井悠貴[1], 中島優一[1], 赤澤真一[1], 志田洋介[2], 小笠原渉[2]([1]長岡高専物質工, [2]長岡技科大生物)

3A26a05　*Thermotoga maritima* 由来耐熱性ホスホヘキソムターゼの活性の解析
9:44　○中澤篤志[1], 佐分利亘[1], 森　春英[1], 吉田靖彦[2], 福井健介[3], 伊吹昌久[2],　津村和伸[3]　([1]北大院農,　[2]不二製油株式会社,　[3]不二製油グループ本社株式会社)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A26a06　好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース生成型 β-アガラーゼの精製と酵素的諸性質の検討および遺伝子の同定
10:05　○樫村佳奈,　岡本真歩,　石井義孝,　桐村光太郎　(早大・先進理工・応化)

3A26a07　*Paenibacillus* 属細菌由来アルギン酸リアーゼの機能解析
10:16　○伊藤貴文, 中川えみ, 要田　萌, 木元　久, 日ビ隆雄　(福井県大・生物資源)

3A26a08　2014-16 年度産の山形県つや姫の品質と登熟温度との関係について
10:27　○矢嶋雄貴[1], 辻井良政[2], 後藤　元[3], 松原芳樹[2], 木村圭一[2], 高野克己[2]　([1]東京農大院・農化,　[2]東京農大応生・化学,　[3]山形農総研セ)

3A26a09　*Pseudomonas* 属細菌の *trans*-アコニット酸資化性に必須なアコニット酸イソメラーゼ
10:38　○滝口有沙,　平磯一輝,　桐村光太郎　(早大・先進理工・応化)

3A26a10　セレン蓄積植物における NAD 依存 GAPDH のセレンによる活性化機構
10:49　○高貝俊生,　武田　徹　(近畿大農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A26a11　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの構造解析
11:10　○金尾忠芳[1],　長谷成記[1],　小坂　恵[2],　上村一雄[1],　玉田太郎[3]([1]岡山大院環境生命,　[2]岡山大自然研支セ,　[3]量子研)

3A26a12　含塩素有機リン難燃剤分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 株の PhoK アルカリホスファターゼの機能解析
11:21　○高橋祥司,　諸岡由佳,　佐伯栞里,　片沼拓士,　阿部勝正,　解良芳夫　(長岡技科大・生物)

3A26a13　*Sphingobium fuliginis* pPDL2 脱落株による有機リン系化合物分解酵素の産生と分泌
11:32　○川原一芳[1], 岩田なつみ[1], 市村紗季[1], 有路沙織[1], 大森　毅[2], 瀬戸康雄[2],　石川暁志[3]　([1]関東学院大理工・生命,　[2]科学警察研究所,　[3]いわき明星大薬)

3A26a14　GH 20 β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼに対する *N,N,N*-trimethyl-D-glucosaminyl(TMG)-chitotriomycin の阻害様式
11:43　○森本雄介[1],　磯田悠太[2],　Suginta Wipa[3],　深溝　慶[3], 伊藤敏幸[2], 野上敏材[2], 大沼貴之[1]　([1]近大院・農, [2]鳥取大院・工, [3]Suranaree Univ)

A27 会場　午前の部(9:00〜11:00)

植物―タンパク質, 酵素 - 機能, 調節―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A27a01　ブラシノステロイド情報伝達におけるマスター転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤
9:00　○野崎翔平[1], 宮川拓也[1], 浅見忠男[1], 中野雄司[2], 田之倉優[1]([1]東大院・農生科, [2]理研CSRS)

3A27a02　カロテノイド異性化酵素 D27 変異体の酵素活性
9:11　○佐藤美咲, 宇都宮玲太, 牧　遼, 伊藤晋作, 佐々木康幸, 矢嶋俊介　(東農大・生命科・バイオ)

3A27a03　システイン合成酵素活性を負に制御するシステイン合成酵素様タンパク質
9:22　○石川知世子[1],　児玉浩明[2]　([1]千葉大・園芸,　[2]千葉大院・園芸)

3A27a04　ダイズ PDI ファミリータンパク質と Ero1 の量的バランスによるタンパク質の酸化的フォールディングの制御
9:33　○奥田　綾, 松崎元紀, 河野慧一, 土雄一朗, 廣瀬明歩, 増田太郎, 裏出令子　(京大院農・農学)

3A27a05　ダイズ ERO1 における新規活性調節機構の検討
9:44　○松崎元紀, 奥田　綾, 成尾由理香, 河野慧一, 増田太郎, 裏出令子　(京大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A27a06　植物アスコルビン酸生合成の鍵酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼの活性調節機構の検討
10:05　○崎山佳祐,　小川貴央,　丸田隆典,　石川孝博　(島根大・生資科・生命工)

3A27a07　ピタヤにおける新規ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼアイソフォーム
10:16　○堂園真佑[1],　前田隆昭[2],　野村啓一[1]　([1]神戸大学,　[2]南九州大学)

3A27a08　植物 RuBisCO は形状記憶能力の獲得によって環境適応を達成
10:27　○横田明穂　(植物ハイテック研・奈良先端大)

3A27a09　大豆種子を用いた小麦種子貯蔵タンパク質の蓄積挙動の解析
10:38　○松岡祐樹[1], 柳原康希[1], 前田紘夢[1], 奥田英子[1], 山田哲也[2], 裏出令子[1],　丸山伸之[1]　([1]京大院農,　[2]北大院農)

3A27a10　イネ種子胚盤由来のカルスを材料とする無細胞翻訳系の構築
10:49　○鈴木　翔, 近藤久海香, 松岡　聡, 戸澤　譲　(埼玉大・院・理工)

A27 会場　午後の部(14:00〜16:00)

植物―生物間相互作用―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A27p01　植物感染性線虫の誘引物質
14:00　○大田守浩[1],　橋口正嗣[2],　明石　良[2], 石田喬志[1], 井田隆徳[2], 澤進一郎[1]　([1]熊本大学,　[2]宮崎大学)

3A27p02　植物免疫活性化剤候補化合物の選抜と作用機構の解析
14:11　○北畑信隆[1]，斉藤優歩[1]，中野正貴[1]，諸橋賢吾[1]，来須孝光[2]，浅見忠男[2]，朽津和幸[1]　([1]東京理科大・応用生物科，[2]東大院・農生科)

3A27p03　ブラシノステロイドによるプライミング誘導機構の解析
14:22　○草島美幸，井上真依，仲下英雄　(福井県大生)

3A27p04　植物共生微生物の定着によりトマトに誘導されるプライミングの解析
14:33　○藤田萌香[1]，草島美幸[1]，加藤久晴[1]，西内　巧[2]，仲下英雄[1]　([1]福井県大，[2]金沢大)

3A27p05　AM 菌が分泌するヘテロキトオリゴ糖共生シグナルの糖鎖配列の決定
14:44　○野島耕陽，秋山康紀　(阪府大院・生命環境)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A27p06　べと病菌感染時におけるブドウの防御応答関連遺伝子の発現解析
15:05　○清水健雄，河野　淳，須崎浩一　(農研機構　果樹茶業研究部門)

3A27p07　葉面常在菌由来の分泌する生分解性プラスチック分解酵素は，植物表層を分解する
15:16　○植田浩一，黒瀬大介，釘宮聡一，光原一朗，吉田重信，田端　純，鈴木　健，北本宏子　(農研機構)

3A27p08　イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析
15:27　○川口雄正[1]，古川岳人[2]，仲　恭輔[1]，中村みなみ[1]，山田孝樹[2]，近藤真千子[2]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ)

3A27p09　植物成長促進細菌 *Aquitalea magnusonii* H3 株によるコウキクサへの付着挙動の解析
15:38　○石澤秀紘[1]，黒田真史[1]，井上大介[1]，森川正章[2]，池　道彦[1]　([1]大阪大院・工，[2]北海道大院・環境)

3A27p10　植物種の違いによる栽培土壌の菌叢変化
15:49　○浅見綾香[1]，山崎　透[2]，前田憲慶[1]，荒木希和子[1]，久保　幹[1]　([1]立命館大学　，[2]立命館大学大学院)

A28 会場　午前の部(9:00〜12:05)

植物―植物工学 - 育種，物質生産，形質転換―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A28a01　珪藻のシリカ形成機構解明に向けた *Nitzschia* 属珪藻の遺伝子組換え系の確立
9:00　根本理子[1]，○白石幸音[1]，田村　隆[1]，真山茂樹[2]，稲垣賢二[1]　([1]岡山大院環境生命，[2]東京学芸大教)

3A28a02　リシノール酸生産により促進される実用珪藻の脂質蓄積
9:11　○本庄智也[1]，梶川昌孝[1]，伊福健太郎[1]，菓子野康浩[2]，福澤秀哉[1]　([1]京大 院 生命科学，[2]兵県大 院 生命理学)

3A28a03　バイオ燃料生産性の向上を目指した光合成能およびワックスエステル生合成能強化ユーグレナの分子育種
9:22　○田茂井政宏[1,2]，岡村桃子[1,2]，作山治美[1,2]，小川貴央[2,3]，石川孝博[2,3]，重岡　成[2,3]　([1]近畿大農，[2]CREST/JST，[3]島根大生資科)

3A28a04　イネ科作物 HIS1 ホモログの試験管内機能改変による除草剤抵抗性遺伝子の創出
9:33　○高村夏生[1]，武井里美[2]，佐久間望[1]，山崎明彦[3]，関野景介[3]，山田祐司[3]，廣瀬咲子[4]，大島正弘[4]，吉田　均[4]，黒木　慎[4]，戸澤　譲[1,2]　([1]埼玉大・理，[2]埼玉大・院・理工，[3]㈱エス・ディー・エス　バイオテック，[4]農研機構・生物機能部門)

3A28a05　イネ科作物由来の HIS1 ホモログ遺伝子を発現する植物の除草剤耐性の解析
9:44　○モンドル慶子[1]，　高村夏生[1]，　村田和優[2]，　前田英郎[3]，山崎明彦[4]，関野景介[4]，山田祐司[4]，吉田　均[5]，廣瀬咲子[5]，大島正弘[5]，加藤　浩[6]，戸澤　譲[1]　([1]埼玉大理，[2]富山県・農林水産総合技術センター，[3]農研機構・中央研，[4]㈱エス・ディー・エス　バイオテック，[5]農研機構・生物機能部門，[6]農研機構・作物開発センター)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A28a06　葉緑体「光スイッチ」を用いた物質生産に向けた活性型抗体可変断片 Fv の作製
10:05　○深澤斗希也[1]，清水正則[2]，伊藤創平[1]，小林裕和[1]　([1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命，[2]常葉大・健康プロデュース)

3A28a07　BE 発現抑制による超高アミロース・コメデンプンの開発
10:16　○後藤大地[1]，阿部　克[1]，白鳥龍一[1]，花城　勲[2]，中村保典[3]，伊藤紀美子[1,4]　([1]新潟大院・自然科学，[2]鹿児島大・農，[3]秋田県立大・生物資源，[4]新潟大・農)

3A28a08　リグニン高含有イネを作る―イネ科バイオマス植物育種のモデル実験―
10:27　○宮本託志[1]，高田理江[1]，鈴木史朗[1]，飛松裕基[1]，山村正臣[1]，刑部敬史[2]，坂本正弘[3]，梅澤俊明[1,4]　([1]京大生存研，[2]徳島大生物資源産業，[3]京大院農，[4]京大グローバル生存基盤)

3A28a09　ソース / シンク同時強化サツマイモの作出とその評価
10:38　○冨本優美[1]，　田部記章[2,5]，　大鳥久美[2,5]，　菊池　彰[3,5]，田茂井政宏[1,2,5]，横田明穂[4,5]，重岡　成[1,2,5]　([1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]筑波大・GRC，[4]植物ハイテック，[5]JST, CREST)

3A28a10　ジャガイモへの多重遺伝子導入による光合成と塊茎形成能力の同時強化
10:49　○加藤　彰[1]，小川太郎[1]，蘆田佳子[1]，佐野和子[1]，青木洋代[1]，米光　歩[1]，渡邉園恵[1]，重岡　成[2]，横田明穂[1,3]　([1]植物ハイテック研，[2]近畿大・農・バイオ，[3]奈良先端大)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A28a11　独自のベクターと高密度水耕栽培法を活用したゲノム編集によるコメ品質関連遺伝子の多重改変
11:10　○黒田昌治，　山口知哉，　山川博幹　(農研機構中央農研北陸拠点)

3A28a12　コムギにおける *in planta* ゲノム編集技術の開発
11:21　濱田晴康[2]，LIU Yuelin[1]，LINGHU Qianyan[1]，柳楽洋三[2]，三木隆二[2]，田岡直明[2]，○今井亮三[1]　([1]農研機構生物部門，[2]㈱カネカ)

3A28a13　CRISPR/Cas9 を用いた *Jatropha curcas* L. のゲノム編集の試み
11:32　○藤波友樹[1]，児玉　岳[2]，十川太輔[1]，松川哲也[1]，大和勝幸[1]，梶山慎一郎[1]　([1]近畿大学院生物理工，[2]近畿大学生物理工)

3A28a14　植物ゲノム編集ツール，Emerald Gateway TALEN system の改良とその評価
11:43　○小野寺瞳[1]，堀江峻晃[1]，紀平望帆[1]，青木(無津呂)裕美[2]，草野博彰[3]，今村智弘[4]，寺村　浩[1]，島田浩章[1]　([1]東京理科大・生物工，[2]現，理研・環境資源科学研究センター，[3]現，京大・生存圏研究所，[4]現，石川県立大)

3A28a15　ゲノム編集によるジャガイモ CYP88B1 遺伝子の破壊
11:54　○安本周平[1]，李ヒョン宰[2]，秋山遼太[2]，澤井　学[1]，島津知華[1]，關　光[1]，梅基直行[3]，水谷正治[2]，斉藤和季[3]，村中俊哉[1]　([1]阪大院・工，[2]神戸大院・農，[3]理研・CSRS)

A28 会場　午後の部（14:00〜14:55）

植物―植物工学 - 育種，物質生産，形質転換/その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A28p01　組換えタンパク質生産における一過的発現システムの改良
14:00 ○三浦謙治[1], 星川　健[1], 山本剛史[1], 江面健太郎[1], 岡澤梨沙[1], 藤田　聡[1], 高岡美予[1], フーメイソン[2], 江面　浩[1]（[1]筑波大学生命環境，[2]アリゾナ州立大学）

3A28p02　膜交通を利用したプラスチドタンパク質蓄積技術の開発：TMN1 のプラスチドターゲティング機構
14:11 ○三ッ井敏明[1,2], 河田圭介[2], 新井琢也[1], 古賀　彩[1], 高松　壮[2], 猪俣拓也[2], 金古堅太郎[2], バスラムマロワン[1]（[1]新潟大農，[2]新潟大自然研）

3A28p03　水耕栽培により得られた桑根抽出液の機能性について
14:22 ○関慎太郎[1], 深井隆稔[2], 神戸隆介[3], 木下　明[4], 本間知夫[1,2]（[1]前橋工科大院生物工学, [2]前橋工科大生物工学, [3]㈱神戸万吉商店, [4]ハイトカルチャ㈱）

3A28p04　イネ由来 XIP 型キチナーゼ様タンパク質（OsXIP）のキシラナーゼ阻害活性評価
14:33 ○田中　盾，大沼貴之（近大院農）

3A28p05　側枝形成を制御する糖シグナリング因子の探索
14:44 ○大鳥久美[1,2], 中西宏樹[1], 田部記章[1,2], 田茂井政宏[1,2], 重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]JST,CREST）

A29 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化/遺伝子 - 機能，発現制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A29a01　植物 5-アミノレブリン酸トランスポーターの機能
9:00 ○金丸研吾[1,2], 中来田卓磨[1], 田中節彦[1], 坂本みのり[2], 黒田修司[3], 宇野知秀[1,2]（[1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]神戸大自）

3A29a02　4-ヒドロキシ-5-アミノ-バレリン酸（HAVA）によるシロイヌナズナの遺伝子発現応答
9:11 ○岩村咲良[1], 田中節彦[1], 坂本みのり[2], 黒田修司[3], 斉藤　優[4], 池田智明[4], 渡邊繁幸[4], 宇野知秀[1], 金丸研吾[1]（[1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]神戸大自，[4]コスモ石油）

3A29a03　塩基性 helix-loop-helix 転写因子 bHLH101 が関与する光酸化的ストレス応答機構の解析
9:22 ○田部記章[1], 野志昌弘[2], 高木　優[3], 田茂井政宏[1], 重岡　成[1]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]和歌山信愛・生活・食栄，[3]埼玉大・環境セ）

3A29a04　細胞内鉄恒常性に関与するシロイヌナズナ bHLH11 転写因子の解析
9:33 ○野沢昂太郎[1], 田部記章[1], 野志昌弘[2], 田茂井政宏[1], 重岡　成[1]（[1]近畿大，[2]和歌山信愛大）

3A29a05　被覆栽培したチャの被覆解除後の光照射に対する応答
9:44 ○森田重人[1,2], 濵野奈津[1], 長田充洋[3], 竹本哲行[3], 佐野　智[1], 増村威宏[1,2]（[1]京都府大生命環境，[2]京都農技セ生資セ，[3]京都農技セ農林セ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A29a06　Stress induction of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in tomato plants: An attempt to mitigate using mannitol and catechin
10:05 ○ Wahdatullah KHPALWAK[1,2], Hiroshi SAKUGAWA[1]（[1]Dept. of Environmental Dynamics and Management, Grad. School of Biosphere Science, Hiroshima Univ., [2]Plant Protection Dept. Faculty of Agriculture, Nangarhar Univ.）

3A29a07　Assessment of hybrid vigour using intraspecific Arabidopsis hybrids
10:16 ○ Thi Ngoc Quynh Le[1], Naoya Sugi[1], Miyako Kusano[1,2], Kazuki Saito[2,3], Hiroshi Shiba[1]（[1]Grad. sch. of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]RIKEN, CSRS, [3]Chiba Univ.）

3A29a08　シロイヌナズナ種内雑種における代謝物プロファイリング
10:27 ○杉　直也[1], レティノクィン[1], 草野　都[1,2], 斎藤和季[2,3], 柴　博史[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]理研・CSRS，[3]千葉大・薬）

3A29a09　アスコルビン酸生合成主要因子 *VTC2* の発現を調節する転写因子の機能解析
10:38 ○崎下絢子[1], 中川泰斗[2], 田部記章[2], 田茂井政宏[1,2], 重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ）

3A29a10　ヒメツリガネゴケの PAS-HK は茎葉体形成を抑制する
10:49 ○龍　昌志[1], 山篠貴史[2], 野本友司[2], 後藤友規[1], 一瀬瑞穂[3,4], 佐藤健介[5], 杉田　護[3], 青木摂之[1,5]（[1]名大院情科，[2]名大院生命農，[3]名大遺伝子，[4]名大ITbM，[5]名大院情報）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A29a11　サツマイモ不定根原基特異的発現を示す転写抑制因子 IbPLATZ の機能解析
11:10 ○瀬古友梨恵[1], 村上　聡[2], 田部記章[2,3], 田茂井政宏[1,2,3], 重岡　成[1,2,3]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]CREST・JST）

3A29a12　ストレスに応答した青シソ二次代謝関連遺伝子の発現制御
11:21 平安山昌史[1], 井口広也[1], 加川夏子[2], ○華岡光正[1]（[1]千葉大院・園芸，[2]千葉大・環境健康フィールド科学セ）

3A29a13　クルクリゴ属植物における次世代シーケンサーを用いたネオクリン類似遺伝子グループの発現解析
11:32 ○大久保智史[1], 寺内かえで[2], 山浦高夫[1], 阿部啓子[2], 朝倉富子[2]（[1]日本新薬㈱，[2]東大院農生科・応生化）

3A29a14　ユーグレナにおける Nuxix hydrolase ファミリーの機能解析
11:43 鈴置友伽[1], 瀧下龍之助[1], 小川貴央[2], 石川孝博[2], ○吉村和也[1]（[1]中部大応生食栄，[2]島根大生資科生命工）

3A29a15　Involvement of abiotic stress-related bZIP transcription factors on the regulation mechanism of branched chain amino transferase in Oryza sativa
11:54 ○Tun Yee Yee, Takumi Matsuo, Takashi Yuasa（Miyazaki University）

A29 会場　午後の部（14:00〜15:27）

植物―遺伝子 - 機能，発現制御/その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A29p01　Combi-OGAB 法を利用した最適コドンの探索
14:00 ○寺井悟朗[1], 高橋俊介[2], 中村朋美[2], 柘植謙爾[2], 石井　純[2], 浅井　潔[1]（[1]東京大学，[2]神戸大学）

3A29p02　細胞内局在を改変したキュウリモザイクウイルス 2b タンパク質が RNA サイレンシングに与える影響
14:11 ○下川麻優子，児玉浩明（千葉大院・園芸）

3A29p03　超低温保存後の交雑ポプラ茎頂の個体再生率向上への試み
14:22 ○川村浩平[1], 嘉見大助[2], 鈴木伸吾[1], 田中大介[3], 遠藤圭太[4], 大槻祐香子[1], 藤川清三[1], 山岸祐介[1], 荒川圭太[1]（[1]北大農，[2]農研機構北農研セ，[3]基生研IBBPセ，[4]森林総研林育セ）

3A29p04　根こぶ病菌の試験管内感染実験系の構築にむけた園芸種ハクサイのカルス化とその発根の検討
14:33 ○岡田香保[1], 早崎君江[1], 櫛谷綾香[2], 東　慶直[1,2]（[1]近畿大学大学院生物理工学研究科，[2]近畿大学生物理工学部）

3A29p05　籾殻シリカ形成の分子機構解明に向けたタンパク質の探索
14:44 ○安孫子澪，後藤千佳，尾崎紀昭（秋県大生資科）

p06〜p07 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A29p06　インドール 3 酢酸の海藻カロテノイドへの影響
15:05　○垣田浩孝[1]，小比賀秀樹[2]　([1]日大文理，[2]産総研健康工学)

3A29p07　サイクリックボルタンメトリーを用いた Fe キレート錯体のフェントン活性評価
15:16　○有賀智子[1]，鈴木俊宏[1]，朝海敏昭[1]，鈴木道生[2]，吉村悦郎[3]　([1]産総研　計量標準，[2]東大院農生科応生化，[3]放送大学)

B02 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B02a01　腸内環境を介した豆類由来タンパク質のエネルギー代謝制御機構の解明
9:00　○中谷明穂[1], Li Xuan[1,2], 宮本潤基[1,2], 橘　信彦[3], 河野光登[3], 井上　啓[4],　木村郁夫[1,2]　([1]東京農工大学大学院 農学研究院，[2]AMED-CREST，[3]不二製油グループ本社株式会社，[4]金沢大学新学術創成研究機構)

3B02a02　日本の食用きのこ摂取はマウスの肥満を抑制する.
9:11　○清水崇光[1], 森光一郎[1], 都築　毅[2]　([1]ホクト, [2]東北大院・農)

3B02a03　発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果
9:22　○本郷玲奈[1]，　松元拓也[2]，　徳丸浩一郎[3]，　白畑實隆[4]，照屋輝一郎[1,2,4]　([1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]日本ケフィア，[4]九大院農院)

3B02a04　2 型糖尿病モデル動物を用いたビフィズス菌発酵乳の肥満抑制効果
9:33　○丸田ひとみ[1], **王　承铎**[2], 天満晴菜[3], 馬　芸[1], 中村昇二[4], 藤井祐介[4], 豊川直樹[4], 山下広美[3]　([1]岡県大院・保福・保福科，[2]岡県大院・保福・栄養，[3]岡県大・保福・栄養，[4]オハヨー乳業㈱)

3B02a05　プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と体温変化の解析
9:44　○青山広樹[1]，兵頭拓真[1]，神谷美沙[1]，西川　翔[1]，宮田　涼[2]，吉村一輝[2]，熊澤茂則[2]，津田孝範[1]　([1]中部大・応生，[2]静岡県大・食品栄養)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B02a06　蛍光強度を指標とした非侵襲的 UCP1 転写活性評価モデルマウスの作出
10:05　○川原崎聡子[1], 桑田秀俊[1], 坂本智弥[1], 新田貴大[1], 鄭　憲芬[1], 高橋春弥[1]，　野村　亘[1,3]，　荒　　武[1]，　高橋信之[1,3]，　冨田江一[2]，後藤　剛[1,3]，河田照雄[1,3]　([1]京大院農・食品生物，[2]高知大医，[3]京大・生理化学研究ユニット)

3B02a07　DPP-4 阻害剤テネリグリプチンが脂肪組織の UCP-1 発現に与える影響
10:16　○澤崎穂菜美[1]，　武田健一郎[1]，　高橋春弥[1]，　野村　亘[1,2]，鄭　憲芬[1]，　荒　　武[1]，　高橋信之[1,2]，　大里直樹[3]，　瀬尾茂人[3]，松田秀雄[3], 河田照雄[1], 後藤　剛[1]　([1]京大院農・食品生物, [2]京大・生理化学研究ユニット，[3]阪大院情報・バイオ情報工学)

3B02a08　食餌性肥満(DIO)マウスにおける，アロエベラゲル抽出物(AVGE)投与による褐色脂肪組織に対する作用の検討
10:27　○多田明日翔[1]，　田中美順[1]，　三澤江里子[1]，　齊藤万里江[1]，鍋島かずみ[1], 山内恒治[1], 阿部文明[1], 後藤　剛[2,3], 河田照雄[2,3]　([1]森永乳業・素材応用研究所，　[2]京都大学大学院農学研究科・食品生物科学専攻，[3]京都大学・学際融合教育研究推進センター)

3B02a09　糖転移ヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化の誘導
10:38　○西川　翔[1], 兵頭拓真[1], 青山広樹[1], 長尾つばさ[1], 中西章仁[2], タンジャマハマドゥ[2]，津田孝範[1]　([1]中部大・応生，[2]東洋精糖㈱)

3B02a10　ガーリック由来香気成分は，体熱産生非依存的に肥満を抑制する
10:49　○瀬尾希来, 増澤(尾﨑)依, 細野　崇, 関泰一郎　(日大院・生資科・応生科)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B02a11　人工消化物の静脈内投与によるチョウザメ由来コラーゲンペプチドの血糖上昇抑制作用機序の検討
11:10　○笹岡友季穂，岸村栄毅　(北大院水)

3B02a12　*Plectranthus barbatus* の抗メタボリックシンドローム作用
11:21　○加藤悠理海，小林菜奈，成田優里，只石　幹，清水　誠，服部一夫　(東農大応生科)

3B02a13　サツマイモ焼酎粕発酵物のメタボリックシンドローム予防効果
11:32　○小境敏揮[1,3], 野別　亮[2], 鈴木彩花[2], 章　　超[3], 河野邦晃[3], 岩井謙一[3]，高瀬良和[3]，西山和夫[1,2]，山崎正夫[1,2]　([1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科，[2]宮崎大学農学部，[3]霧島酒造)

3B02a14　高脂肪食誘発肥満モデルマウスにおけるゴボウスプラウトエキスの抗肥満作用
11:43　○渡部晋平, 大野晶子, 与茂田敏, 稲益悟志　(クラシエホールディングス株式会社　経営企画室企画部R&D戦略推進チーム)

3B02a15　昼夜逆転摂食とシフト摂食など不規則な摂食タイミングによる肝臓概日時計と脂質代謝の異常
11:54　○渡辺彩子[1], 片岡裕太郎[1], 小林　悟[1], 梅木美樹[2], 望月　聡[2], 小田裕昭[1]　([1]名大院生命農，[2]大分教育)

B02 会場　午後の部(14:00〜15:38)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝/食品機能・栄養 - 癌，抗癌―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B02p01　筋分化誘導型オリゴ DNA は横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する
14:00　○進士彩華[1], 中村駿一[1], 二橋佑磨[2], 梅澤公二[1,3], 下里剛士[4], 高谷智英[1,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研，[4]信州大菌類・微生物セ)

3B02p02　生薬分子ベルベリンおよびパルマチンは横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する
14:11　○中村駿一[1], 進士彩華[1], 二橋佑磨[2], 梅澤公二[1,3], 高谷智英[1,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研)

3B02p03　赤シソ由来メトキシフラバノン PDMF の p53 依存性癌抑制作用とチロシンキナーゼ阻害剤併用による相乗的抗腫瘍効果
14:22　藤村孝志[1]，　MOHAMED Amer Ali Abdelhafeez[1]，宮本泰輔[2]，平川規子[3]，馬場堅治[3]，小埜和久[1]，○河本正次[1]　([1]広島大院・先端・生命機能，[2]広島大・工・発酵工学，[3]三島食品・研究所)

3B02p04　酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタマメ抽出物の併用による抗腫瘍作用の増強
14:33　○立岩宏彬[1], 宮本茉摘[1], 江藤　博[2], 白畑實隆[3], 照屋輝一郎[1,3]　([1]九大院生物生資環，[2]第一産業㈱，[3]九大院農院)

3B02p05　酵素消化低分子化フコイダン抽出物とケトン体併用による抗腫瘍効果
14:44　○尾崎　健[1]，　江藤　博[2]，　白畑實隆[3]，　照屋輝一郎[1,3]　([1]九大院生生資環，[2]第一産業㈱，[3]九大院農院)

p06〜p08 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B02p06　リンゴおよびイシモズクによる細胞競合促進機構の解析
15:05　○永長一茂，中井雄治　(弘前大学)

3B02p07　がん抑制タンパク質 TSC2 のメチル化修飾による安定性への関与についての解析
15:16　○玄　成秀, 松本雄宇, 鈴木　司, 小林謙一, 山本祐司　(東農大応生化)

3B02p08　エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響と食品ポリフェノールによるその緩和
15:27　○安岡顕人[1]，亀井飛鳥[1]，篠崎文夏[1]，嶋田耕育[1]，野原正勝[1]，飯尾将太[1]，近藤　香[2]，岡田晋治[3]，近藤　隆[2]，阿部啓子[1,3]　([1]地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所，[2]理化学研究所統合生命医科学研究センター，[3]東京大学大学院農学生命科学研究科機能性食品ゲノミクス)

B03 会場　午前の部(9:00〜11:54)

食品―食品機能・栄養 - 脂質代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B03a01　プーアル・ウーロンミックス茶の摂取は肥満マウスの腸内細菌叢および脂質代謝を改善する
9:00　○板倉彰吾[1]，荒谷　豪[1]，石村友里[1]，下川浩太[1]，山本広晃[2]，小栗武浩[2]，平井　静[1]，江頭祐喜合[1]　([1]千葉大院園芸，[2]アサヒ飲料㈱)

3B03a02　昆布の食物繊維が食餌性肥満に及ぼす影響
9:11　○高谷直己[1]，紙谷年昭[1]，戸田登志也[1]，青江誠一郎[2]　([1]フジッコ株式会社，[2]大妻女子大学)

3B03a03　メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウスのコレステロール代謝に与える影響
9:22　○豊田　集[1,2]，石島智子[1]，亀井飛鳥[2]，阿部啓子[1,2]，岡田晋治[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]産技総研)

3B03a04　ポモル酸の投与がラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響
9:33　○井土良一[1]，甲木孝弘[1]，豊田　集[2,3]，石島智子[2]，阿部啓子[2,3]，岡田晋治[2]　([1](公財)東洋食品研究所，[2]東大院農生科・応生化，[3]産技総研)

3B03a05　バラ花弁中のポリフェノールである Eugeniin はヒト肝細胞における LDL 受容体活性化に関与する
9:44　○川口勇矢[1]，岡田健司[2]，岡田利孝[3]，長岡　利[1,2]　([1]岐阜大自然科学，[2]岐阜大応用生物，[3]㈱東洋発酵)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B03a06　脱脂したマアジがラットに及ぼす影響
10:05　○原口　翼[1]，土橋　葵[1]，水田成美[1]，木村このみ[1]，多田早織[1]，馬場郁香[1]，桑原浩一[2]，田中一成[1]　([1]長崎県大，[2]長崎県総合水試)

3B03a07　必須脂肪酸欠乏時のミード酸産生の阻害による肝脂肪蓄積の制御機構
10:16　○市　育代[1]，島村彩乃[2]，林　優里[2]，満留　悠[2]，藤原葉子[1]　([1]お茶大基幹研究院，[2]お茶大院・ライフサイエンス)

3B03a08　高ショ糖食誘発性脂肪肝モデルラットにおける果実果皮に含まれる機能性化合物の同定と作用機構の解析
10:27　○鈴木絢子[1]，宮島詩織[2]，信岡かおる[1,2]，梅木美樹[4]，望月　聡[3]，石川雄一[1,2]　([1]大分大理工，[2]大分大院工，[3]大分大教育，[4]別府大食物栄養)

3B03a09　ユズ果皮エタノール抽出物がクロレトン誘発脂肪性肝疾患モデルラットに与える影響
10:38　○平川えりか[1]，鈴木絢子[2]，信岡かおる[2]，望月　聡[3]，石川雄一[2]　([1]大分大工，[2]大分大理工，[3]大分大教育)

3B03a10　モリンガの体脂肪低減効果の検証
10:49　○吉沼春香[1]，平澤康史[2]，田中　充[1]，松尾伸二[1]，田辺創一[1]，仲村太志[1]　([1]日清食品ホールディングス㈱・グローバルイノベーション研究センター，[2]㈱日本バイオリサーチセンター・試験部)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B03a11　モリンガ葉抽出物による脂肪肝予防効果
11:10　○伊井野貴史，中村唱乃，庄屋雄二，坂下真耶，金　武祚　(㈱ファーマフーズ)

3B03a12　モリンガ葉抽出物からの脂質代謝活性成分の同定
11:21　○久留宮綾人，林　英雄，森田沙代，中村唱乃，坂下真耶，金　武祚　(㈱ファーマフーズ)

3B03a13　中鎖脂肪酸がマウスの肥満に及ぼす影響
11:32　○米津　瞳[1]，増澤(尾﨑)依[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大・生資科・生命化，[2]日大院・生資科・応生科)

3B03a14　更年期に伴う脂質代謝変動に対する共役リノール酸と大豆サポニンの併用摂取効果
11:43　○谷澤　郁[1]，鈴木那菜[1]，長田恭一[1]，戸田登志也[2]　([1]明治大農，[2]株式会社フジッコ)

3B03a15　講演取消

B03 会場　午後の部(14:00〜15:27)

食品―食品機能・栄養 - 脂質代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B03p01　乳酸菌が産生する希少脂肪酸のペルオキシソームにおける代謝
14:00　○森戸克弥[1]，清水良多[1]，北村苗穂子[2]，朴　時範[2]，岸野重信[2]，小川　順[2]，福田達也[1]，小暮健太朗[1]，田中　保[1]　([1]徳大院薬・衛生薬学，[2]京大院農・応用生命)

3B03p02　温州みかん由来セラミドによる表皮セラミド産生促進作用
14:11　○沢田翔一，中島賢則，山本浩明　(株式会社ダイセル)

3B03p03　こんにゃく由来セラミドによるアルツハイマー病予防効果
14:22　○高橋香織[1,2]，湯山耕平[2]，向井克之[1,2]，五十嵐靖之[2]　([1]株式会社ダイセル，[2]北海道大学大学院先端生命科学研究院)

3B03p04　ビワ葉と緑茶三番茶葉を揉捻混合して製造した発酵茶葉はヒトの体脂肪を減少させる
14:33　○田中一成[1]，湯浅正洋[1]，山本咲暁子[1]，大曲勝久[1]，宮田裕次[2]，田中　隆[3]，小野博之[4]，丸　勇史[4]，山村春男[5]　([1]長崎県大栄養健康，[2]長崎県農林技セ，[3]長大医歯薬学，[4]アリメント工業㈱，[5]㈱シャルレ)

3B03p05　食用菊「寿」含有フラボノイドの 3T3-L1 細胞に対する作用
14:44　○仁科淳良[1]，浮谷基彦[1]，深津　誠[1]，山本純平[2]，服部一夫[3]，平井康昭[4]　([1]日大理工，[2]麻布大，[3]東農大，[4]昭和大)

p06〜p07 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B03p06　イサダ由来新規機能性成分 8-HEPE 濃縮素材の開発
15:05　○山田秀俊，　熊谷加奈子，　白石明子，　四戸啓太郎，矢野　明　(岩手生工研)

3B03p07　イサダからのリポキシゲナーゼ同定と 8-HEPE の酵素的生産への利用
15:16　○結城彩花[1]，植村亜衣子[1]，松村英生[2]，矢野　明[1]，山田秀俊[1]　([1]岩手生工研，[2]信州大学基盤研究支援センター)

B04 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B04a01　ニンニク由来香気成分が血管内皮における外因系血液凝固因子の発現に及ぼす影響について
9:00　○有賀彩和子[1]，田村千尋[1]，矢口真実[2]，増澤(尾﨑)依[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大・生資科・生命化，[2]日大院・生資科・応生科)

3B04a02　ADP による血小板凝集に着目したガーリック由来香気成分の抗血栓作用メカニズムの解明
9:11　○中口夏美，増澤(尾﨑)依，細野　崇，関泰一郎　(日大院・生資科・応生科)

3B04a03　高脂肪食負荷ウィスター京都ラットにおける杜仲葉エキスの抗動脈硬化作用
9:22　○高橋佑介[1]，細尾信悟[2]，山口翔平[1]，山﨑　遼[1]，平田哲也[2]，山口康代[2]，　山崎寛生[2]，　中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]小林製薬株式会社)

3B04a04　Piperine の血圧低下作用における一酸化窒素の関与
9:33　○山上友希子，迫　康弘，室賀翔太，小野智美，小泉千枝，小川伸一，　高岡彰子　（大正製薬株式会社　セルフメディケーション開発研究所　基盤研究室）

3B04a05　Effects of long pepper extract on peripheral coldness in Japanese healthy women
9:44　○Susumu Yoshino[1], Miyake Yasuo[1], Kuwahara Hiroshige[1], Shuji Nakata[2]　([1]Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd., [2]CLINTEXE Clinic)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B04a06　ゲニポシド酸の経口摂取は高血圧自然発症ラットにおいて心房性ナトリウム利尿ペプチドの分泌を促進する
10:05　○山口翔平[1]，細尾信悟[2]，高橋佑介[1]，山崎　遼[1]，高橋伶仁[1]，平田哲也[2]，山口康代[2]，山崎寛生[2]，南野直人[3]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]小林製薬株式会社，[3]国立循環器病研究センター)

3B04a07　腹部大動脈瘤の進展・破裂に対する EPA 高含有魚油の影響の評価
10:16　○久後裕菜[1]，橋本佳祐[1]，宮本智絵[1]，柳本賢一[2]，財満信宏[1]，森山達哉[1]　([1]近畿大院・農，[2]日本水産)

3B04a08　ローヤルゼリーに含まれる脂肪酸がラット末梢血流に与える影響
10:27　○菅みちる，奥村暢章，八巻礼訓，山家雅之，橋本　健　（株式会社山田養蜂場本社）

3B04a09　桜島大根抽出成分による血管内皮機能改善効果及び作用機序の解明
10:38　○黒田　怜[1]，數村公子[2]，南　雄二[3]，加治屋勝子[3]　([1]鹿児島大院農，[2]浜松ホトニクス・中研，[3]鹿児島大農)

3B04a10　緑茶の新用途開発に向けた茶葉油の基礎研究
10:49　○若松美里[1]，加治屋勝子[2]，南　雄二[2]　([1]鹿児島大院農，[2]鹿児島大農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B04a11　Na^+/グルコース共輸送担体 1 を阻害する野菜成分の探索および解析
11:10　○鈴木大斗[1]，吉田和敬[2]，相澤宏一[2]，菅沼大行[2]，薩　秀夫[3]　([1]前工大院・工，[2]カゴメ株式会社イノベーション本部，[3]前工大・工)

3B04a12　ニンニク成分アリシンおよびその類似物質がラット大腸陰イオン輸送に及ぼす効果の検討
11:21　○土谷　庸[1]，川俣幸一[2]　([1]東北女子大，[2]東北生活文化大)

3B04a13　熱殺菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 投与によるマウス糞便排泄量の増加
11:32　○三原敏敬[1]，鹿毛菜央[2]，芳崎　奏[2]，熊谷武久[1]，城斗志夫[2]，原　崇[2]　([1]亀田製菓㈱，[2]新潟大農)

3B04a14　*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 加熱殺菌体摂取が健常成人の排便に与える影響
11:43　○齊藤雄飛[1]，沖　守[2]，熊谷武久[1]　([1]亀田製菓株式会社，[2]医療法人社団成守会 成守会クリニック)

3B04a15　小麦ブランとバーリーマックスの同時摂取による日本人の腸内環境に及ぼす相乗効果の検討：二重盲検並行群間試験
11:54　○青江誠一郎[1]，中村史子[2]，藤原　優[2]　([1]大妻女子大学家政学部，[2]CPCC株式会社)

B04 会場　午後の部（14:00〜15:38）

食品―食品機能・栄養 - タンパク 質・アミノ酸代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B04p01　Peptides derived from egg yolk (Hair growth Peptide, HGP®) are responsible to improve hair growth via induction of VEGF expression
14:00　○Caroline Donzeli Pereira[1], Toshio Nakamura[1], Kyungho Park[2], Yoshikazu Uchida[1], Noriko Horie[1], Mujo Kim[1], Satoshi Itami[3]　([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, [3]Department of Regenerative Dermatology, Osaka University)

3B04p02　Imidazole dipeptide homeostasis in heart is controlled by vitamin B6 through maintenance of β-alanine and γ-aminobutyric acid levels
14:11　○Thanutchaporn KUMRUNGSEE, Dwi Eva NIRMAGUSTINA, Noriyuki YANAKA, Norihisa KATO (Hiroshima Univ.)

3B04p03　MRM 法を用いた高感度タンパク質定量システムによる食品機能性評価法の確立
14:22　○平山未央[1]，黒木勝久[1]，永浜清子[1]，橋口拓勇[2]，榊原陽一[1]　([1]宮大農，[2]宮崎県農試)

3B04p04　鶏足酵素分解物の膝関節痛緩和に関する有効成分の同定及び作用機序の解明
14:33　○山田裕晃，中村唱乃，中村紀夫，坂下真耶，堀江健二，金　武祚　（㈱ファーマフーズ）

3B04p05　間葉系幹細胞の Wnt3a 誘導性 TCF 転写活性に対する分岐鎖アミノ酸の影響
14:44　○前西康太，鬼丸祐二，田中　牧，細田明美，金　東浩，佐伯　茂　（大阪市大・院生活科学・生体情報）

p06〜p08 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B04p06　ヒト肝由来 HepG2 細胞におけるタウリンによる遺伝子発現制御機構の解析
15:05　○和多利研二[1]，井前正人[2]，薩　秀夫[3]　([1]前工大院・工，[2]大正製薬㈱，[3]前工大・工)

3B04p07　エゴマおよびエゴマ発酵産物中成分によるコラーゲン産生メカニズムの解析
15:16　○竹内萌恵[1]，加島隆洋[2]，鈴木　寿[2]，北口公司[3]，矢部富雄[3,4]　([1]岐阜大院・自然科学，[2]岐阜県産業技術センター，[3]岐阜大・応生，[4]生命の鎖統合研究センター)

3B04p08　スケトウダラタンパク質の筋量増加効果の作用成分の探索
15:27　○内田健志[1]，宇都宮さち[2]，上東亮太[2]，澤井真梨子[2]，韓　力[1]，藤谷美菜[2]，速水耕介[3]，岡田晋治[4]，岸田太郎[2]　([1]日本水産株式会社　生活機能研，[2]愛媛学院農，[3]横浜薬大・薬・食化学，[4]東大院・農生科・機能性食品ゲノミクス)

B05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B05a01　小胞体ストレスの緩和を介した緑藻カロテノイドの抗炎症作用
9:00　○真鍋祐樹，瀧井靖歩，菅原達也　（京都大院農）

3B05a02　脂肪酸アミドによる抗炎症活性の解析
9:11　○柴田貴広[1]，岡本拓也[1]，吉武　淳[2]，内田浩二[3]　([1]名大院・生命農，[2]名大・未来社会，[3]東大院・農生科)

3B05a03　DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する植物発酵エキス分画物の効果
9:22　○山本美菜[1], 藤田瑞貴[1], 村上允唯[2], 中川泰輔[2], 本多奈保子[1], 渡辺敏郎[1]　([1]園田学園女大・食栄, [2]機能性食品開発研究所)

3B05a04　抗炎症作用を有するクワ葉成分の探索および解析
9:33　○本田瑞希[1], 亀井飛鳥[2], 相田美緒[3], 薩　秀夫[3]　([1]前工大院・工, [2]KISTEC, [3]前工大・工)

3B05a05　食用菊抽出物のミクログリア細胞に対する抗炎症作用の栽培品種による比較
9:44　○若生　豊, 馬　東建　(八戸工大工)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B05a06　ヒスタミン H1 受容体アンタゴニスト活性を有する食品化合物の探索
10:05　○香山凌子, 平野汐奈, 太田広人　(熊本大院自然科学)

3B05a07　卵白及び卵黄の経皮感作能の比較とそれらの感作抗原の同定
10:16　○小川昂志, 岡尾亮祐, 高蓋秋穂, 村上浩規, 岩本和子, 矢野えりか, 財満信宏, 森山達哉　(近大院農)

3B05a08　甲殻類に寄生された魚類が有するアレルギーリスク
10:27　○臼井将勝[1], 出水聡之[1], 杉浦義正[1], 河邉真也[1], 近藤昌和[2], 宮﨑泰幸[1]　([1]水産大学校・食品科学, [2]水産大学校・生物生産)

3B05a09　母乳中 CCL25 含有量と新生児のアトピー性皮膚炎発症との関連に関する研究
10:38　○阿部紗織[1], 山出史也[2], 中野泰至[2], 下条直樹[2], 茶山和敏[1] ([1]静岡大学創造科学技術大学院, [2]千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

3B05a10　ペクチンが食物アレルギーモデルマウスの抗体産生に及ぼす影響の解析
10:49　○山下昇悟[1], 岩城佳那[2], 矢部富雄[1,2,3,4], 北口公司[1,2,3]　([1]岐阜大院・自然科学, [2]岐阜大院・応生, [3]岐阜大・応生, [4]生命の鎖総合研究センター)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B05a11　不飽和脂肪酸乳酸菌代謝産物の免疫調節機能の解析
11:10　○山本愛日[1], 八代拓也[1], 笠倉和巳[1], 岸野重信[2], 小川　順[2], 西山千春[1]　([1]東理大基工, [2]京大院　農)

3B05a12　Kaempferol による RALDH2 発現誘導メカニズム
11:21　○綿貫優実, 八代拓也, 山口昌樹, 笠倉和巳, 西山千春　(東理大基工)

3B05a13　レスベラトロール類縁化合物の免疫抑制作用
11:32　○八代拓也, 由良志織, 笠倉和巳, 西山千春　(東理大基工)

3B05a14　野生型およびミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のサイトカイン産生に及ぼすビタミン C の影響
11:43　○髙取沙織, 荒谷康昭　(横浜市大生命ナノ)

3B05a15　タモギタケ中 β グルカンは M1/M2 マクロファージ分化を調節する
11:54　○湊健一郎[1], 小原章裕[1,2]　([1]名城大農, [2]名城大院)

B05 会場　午後の部(14:00〜15:49)

食品―食品機能・栄養 - 免疫, 炎症, アレルギー・アレルゲン/食品機能・栄養 - 酸化, 抗酸化, 糖化, 抗糖化, 老化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B05p01　ポリフェノールオキシダーゼによる茶カテキンの自然抗体リガンド生成能の増強
14:00　○今堀夏奈美[1], 三輪恭行[1,2], 李　相美[1], 柴田貴広[1], 内田浩二[3] ([1]名大院・生命農, [2]佐藤食品工業㈱, [3]東大院・農学生命)

3B05p02　自然抗体エピトープを有する食品成分の探索
14:11　○三輪恭行[1,2], 今堀夏奈美[2], 古橋麻衣[2], 柴田貴広[2], 内田浩二[3] ([1]佐藤食品工業㈱, [2]名大院・生命農, [3]東大院・農学生命)

3B05p03　IFN-γ 産生増強を促す野沢菜由来活性成分の探索
14:22　○山本佳奈, 古屋花暖, 山田和輝, 髙橋楓香, 濵島知里, 田中沙智　(信州大院・総合理工・農)

3B05p04　発酵青バナナ末(バナファイン®)経口摂取による免疫賦活効果の検討
14:33　○金　有宏[1], 昆　良子[1], 石田有希子[1], 堀江健二[1], 坂下真耶[1], 渡辺陽介[2], 扇谷えり子[3], 松田　修[3], 金　武祚[1]　([1]㈱ファーマフーズ, [2]㈱ドール, [3]京都府立医科大学)

3B05p05　食品コウジカビの T 細胞応答調節効果：自己免疫疾患モデルマウスを用いた解析
14:44　○北爪里欧[1], 河野菜摘[1], 利根川直也[1], 若井寿樹[1], 宇田佳功[1], 関口昭博[2], 榎本　淳[1]　([1]群大院理工, [2]群馬産技セ)

p06〜p09 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B05p06　白金ナノコロイドはパラジウムアレルギーを抑制する
15:05　○澁谷修一[1,2], 立花知子[1], 横手幸太郎[1], 清水孝彦[1]　([1]千葉大院医, [2]日本学術振興会特別研究員 DC[1])

3B05p07　生理的濃度のルテオリンは Nrf2-Keap1 経路を薬物代謝第 II 相酵素の発現量を調節する
15:16　○北風智也[1], 牧山敦志[2], 山下陽子[2], 芦田　均[2]　([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・農)

3B05p08　SIRT6 活性化食品成分による DNA 損傷の修復
15:27　○川野元一[1], 松岡沙季[1], 片倉喜範[1,2]　([1]九大院・生資環, [2]九大院・農院)

3B05p09　がん細胞に高い増殖阻害活性を示すアーユルヴェーダハーブの探索
15:38　○山田なつき[1], 高氏裕貴[1,2], 三木健輔[1,2], 鮎澤　大[1,2], 藤井道彦[1]　([1]横市大生命ナノシステム, [2]イチバンライフ㈱)

B06 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - 酸化, 抗酸化, 糖化, 抗糖化, 老化―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B06a01　デルフィニジンのマイクロ RNA 発現調節による廃用性筋萎縮抑制作用
9:00　○村田　希, 立花宏文　(九大院農院・生機科)

3B06a02　運動及び β-ヒドロキシ-β-メチル酪酸とブラックジンジャー投与がサルコペニアに与える影響
9:11　○青木　海, 今野雅生, 城本　淳, 時野谷勝幸, 本多克成, 竹越一博, 大森　肇　(筑波大)

3B06a03　育毛効果のある食品成分に関する研究
9:22　○松尾花佳[1], 久保智里[2], 片倉喜範[3]　([1]九大院・シス生, [2]九大院・生資環, [3]九大院・農院)

3B06a04　モリンガ葉抽出物の化粧品利用における可能性
9:33　○庄屋雄二[1], 斉藤憲二[1], 中村紀夫[1], 坂下真耶[1], 山津淳史[1], 堀江典子[1], 齋藤洋子[2], 玉城美根子[2], 金　武祚[1]　([1]㈱ファーマフーズ, [2]㈱シャルレ)

3B06a05　蜜花豆抽出物におけるヒト有効性試験による抗シワ効果の検証
9:44　○石田和人[1], 草川太郎[1], 石田有希子[2], 斉藤憲二[2], 昆　良子[2], Binti Jasni Nur Nadia[2], 坂下真耶[2], 内田良一[2], 金　武祚[2]　([1]㈱フューチャーラボ, [2]㈱ファーマフーズ)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B06a06　食餌誘導性肥満モデルマウスを用いたトマトの酸化ストレス軽減効果の検討
10:05　○若木　学, 後藤真生, 橋本直人, 石川(高野)祐子　(農研機構・食研)

3B06a07　3 種類の麹菌を用いて調製した外皮を含む粒状穀類の麹と塩麹の抗酸化活性
10:16　○韓　宝祥[1], 原　崇[2], 城斗志夫[2]　([1]新潟大院自然科学, [2]新潟大農)

3B06a08　フキノトウエキスに含まれる抗酸化成分の同定および生体抗酸化性
10:27　○近藤(比江森)美樹[1]，上原穂香[2]，新家大輔[2]，新居美香[2]
([1]徳島文理大人，[2]徳農技セ)

3B06a09　タモギタケ中の ergothioneine の抗酸化機序に関する研究(第 2 報)
10:38　○安藤知佳[1]，大社勇太[2]，三谷茂樹[2]，森光康次朗[1]　([1]お茶大院・食品科学，[2]香栄興業株式会社)

3B06a10　黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用
10:49　○川上賀代子[1]，有澤鮎美[1]，守谷智恵[1]，槙野祐子[2]，畑中唯史[3]，坪井誠二[1]　([1]就実大薬，[2]岡山農業研，[3]岡山生物研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B06a11　超浅煎り焙煎コーヒー豆に含まれるキサンチンオキシダーゼ阻害物質の探索
11:10　○本田沙理[1]，福山侑也[1]，増田晃子[2]，増田俊哉[1]　([1]大阪市大院生活，[2]四国大生活)

3B06a12　カフェ酸の加熱反応により生成するビニルカテコール型キサンチンオキシダーゼ阻害剤の同定
11:21　○福山侑弥[1]，本田沙理[1]，増田晃子[2]，増田俊哉[1]　([1]大阪市大院・生活，[2]四国大・生活)

3B06a13　リポソームを用いた抗酸化反応系におけるロスマリン酸と各種抗酸化物の相互作用解析
11:32　○南　育子，鈴木敦弓，井口鈴音，小林弘司，石川洋哉　(福岡女子大学　国際文理)

3B06a14　ローズマリー抽出物であるカルノシン酸は破骨細胞の分化を抑制する
11:43　○真田洋平[1,2]，味八木茂[1,2]，渡邊恵里花[1]，石川正和[1]，中佐智幸[1]，安達伸生[1]　([1]広島大医歯薬，[2]広島大病院)

3B06a15　有用芳香族アミノ酸代謝物の発酵食品における分布と食品微生物による生産性に関する研究
11:54　○木村優花[1]，青木玲二[2]，高山喜晴[2]，鈴木チセ[2]，鈴木義人[1]
([1]茨城大農，[2]農研機構・畜産部門)

B06 会場　午後の部(14:00〜16:00)

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B06p01　乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC と菌体外多糖(EPS)の線虫 *C. elegans* に対する寿命延長効果
14:00　○小阪英樹[1]，小村智美[2]，戸田登志也[1]，西川禎一[3]　([1]フジッコ株式会社，[2]奈良女子大・食物栄養，[3]大阪市大院・生活科学)

3B06p02　遊離脂肪酸によって生じる細胞老化に対するダイゼインの効果について
14:11　○三谷塁一[1]，片山　茂[1,2]，中村宗一郎[2]　([1]信州大・先鋭領域融合，[2]信州大・総合理工(農学専攻))

3B06p03　ヒストンのアセチル化を介した梅リグナンによる線虫の寿命延長効果
14:22　○名取貴光，遠山千晶　(山梨学院大健康栄養)

3B06p04　糖質制限食の長期摂取が老化に与える影響
14:33　○捨田利望実，山本和史，都築　毅　(東北大院・農)

3B06p05　培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える
14:44　○高氏裕貴[1,2]，山田なつき[1]，鮎澤　大[1,2]，藤井道彦[1]　([1]横市大生命ナノシステム，[2]イチバンライフ㈱)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B06p06　マウス加齢性難聴を抑制する食品素材の探索
15:05　○大池秀明[1]，木元広実[2]　([1]農研機構・食品研，[2]農研機構・畜産研)

3B06p07　カルノシンによる腸管アンチエイジングとその分子基盤
15:16　○尾上詩織[1]，藤井　薫[3]，佐藤三佳子[2]，片倉喜範[3]　([1]九大院シス生，[2]日本ハム，[3]九大農院)

3B06p08　カルノシンの腸管バリア増強効果
15:27　○篠崎諒介[1]，大津　出[1]，藤井　薫[3]，佐藤三佳子[2]，片倉喜範[3]
([1]九大院生資環，[2]日本ハム，[3]九大院農院)

3B06p09　Pyridoxamine による網膜色素上皮細胞保護効果の検証と機構解析
15:38　○山下知佳[1]，井出涼子[2]，甲斐建次[2]，須山享三[3]，赤川　貢[2]
([1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大院・生命環境，[3]東北大院・医学)

3B06p10　ローヤルゼリーが老齢マウスの腸内細菌叢に及ぼす影響
15:49　○石川朋美[1]，奥村暢章[1]，戸田年彦[2]，小澤裕介[2]，清水孝彦[2]，生田智樹[1]，立藤智基[1]　([1]株式会社山田養蜂場本社，[2]千葉大院医先進加齢医学)

B07 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B07a01　離乳直後のラットにおける短期間咀嚼が海馬に与える効果の評価
9:00　○宮口一勢[1]，永井俊匡[2]，斉藤芳和[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]
([1]東大院農生科・応生化，[2]高崎健大・栄養，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)

3B07a02　離乳直後の短期間咀嚼は視床の GABA シグナリングを亢進して樹状突起スパインを減少させる
9:11　○永井俊匡[1]，小川真奈[2]，齋藤芳和[2]，宮口一勢[2]，阿部啓子[2,3]，朝倉富子[2]　([1]高崎健大・栄養，[2]東大院農生科・応生化，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)

3B07a03　過去の味刺激に伴う味嗜好性変化に関与する脳領域の解析
9:22　○山口雅裕，成川真隆，三坂　巧　(東大院農・農生科)

3B07a04　老化促進モデルマウスを用いた加齢依存的な味嗜好性変化とその発生要因の検討
9:33　○上吉原絢，成川真隆，河江真宏，幸田理恵，三坂　巧　(東大院農生科)

3B07a05　離乳期のマウス大脳皮質において食刺激依存的な発現変動を示す遺伝子の解析
9:44　○河江真宏，成川真隆，三坂　巧　(東大院農生科・応生化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B07a06　*Bifidobacterium breve* A1 によるアルツハイマー病モデルマウスの認知障害に対する対する改善作用
10:05　○小林洋大[1]，嶋田耕育[2]，密山恵梨[1]，久原徹哉[1]，安岡顕人[2]，近藤　隆[2,3]，阿部啓子[2,4]，清水金忠[1]　([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所，[2]地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所食品機能性評価グループ，[3]国立研究開発法人 理化学研究所 統合生命医科学研究センター，[4]東京大学大学院 農学生命科学研究科)

3B07a07　*Bifidobacterium breve* A1 による軽度認知障害の方の認知機能に対する改善作用の可能性〜単群前後比較試験〜
10:16　○前畑葉月[1]，小林洋大[1]，木下　徹[2,3]，松本彰男[4]，吉野一弘[4]，斉藤　功[2]，清水金忠[1]　([1]森永乳業株式会社研究本部，[2]愛媛大医，[3]ちいき進かがく株式会社，[4]あき整形外科リハビリテーションクリニック)

3B07a08　*Bifidobacterium breve* A1 による統合失調症の抑うつ不安症状に対する改善作用の可能性ならびにレスポンダーとノンレスポンダーの検討
10:27　○勝又紀子[1]，大久保亮[2]，小田巻俊孝[1]，清水金忠[1]，松岡　豊[2]
([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所，[2]国立研究開発法人国立がん研究センター 社会と健康研究センター 健康支援研究部)

3B07a09　空腹による味覚感受性変化を制御する外側視床下部神経の解析
10:38　○傅　　欧[1]，岩井　優[1]，三坂　巧[1]，中島健一朗[1,2]　([1]東大院農生科・応生化，[2]生理学研究所)

3B07a10　栄養状態が橋結合腕傍核の味覚応答神経に与える影響の検証
10:49 ○岩井　優[1]，傅　　欧[1]，三坂　巧[1]，中島健一朗[1,2]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]生理学研究所）

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

3B07a11　ヒト甘味受容体安定発現細胞株の応答性向上の試み
11:10 ○竹谷千晶，三坂　巧（東大院農生科・応生化）
3B07a12　2 種の III 型味細胞と味神経間の情報伝達機構の解明
11:21 ○藤本典大，清水英憲，林由佳子（京都大学大学院　農学研究科　農学専攻　品質評価学分野）
3B07a13　味細胞の構成割合の変化が味覚神経の存在比に与える影響
11:32 ○成川真隆[1]，　前田尚廣[1]，　石丸喜朗[1,2]，　山本くるみ[1]，阿部啓子[1,3]，　三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]明治大農・農化，[3]神奈川県立産業技術総合研究所）
3B07a14　緑葉タンパク質由来の新規グレリン分泌抑制ペプチドの発見
11:43 ○徳山雄基[1]，中戸絢也[1]，倉林篤史[2]，佐藤　大[2]，鈴木秀幸[2]，金本龍平[1]，　大日向耕作[1]（[1]京大院農食品生物，[2]かずさDNA研究所・バイオ研究開発部）
3B07a15　*Lactobacillus brevis* SBC8803 株によるグレリン分泌促進作用および食欲増進作用
11:54 ○齋藤弘貴，中北保一，土屋陽一（サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所）

B07 会場　午後の部（14:00～16:00）

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00

3B07p01　新規霊長類消化管オルガノイド構築と機能解析
14:00 ○熊木竣佑[1]，稲葉明彦[2]，木下和弥[2]，齊藤万佐子[2]，中村倫果[2]，今井啓雄[3]，　粟飯原永太郎[4]，山根拓実[1,2]，大石祐一[1,2]，岩槻　健[1,2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]京大霊長研ゲノム進化，[4]シンシナティ大医）
3B07p02　塩味を想起する香りと食経験
14:11 ○河合崇行[1]，日下部裕子[1]，和田有史[2]（[1]農研機構食品，[2]立命館大学理工）
3B07p03　白ワインの酸味に影響する因子について
14:22 ○斉藤史恵，下村豪志，新海有貴，久本雅嗣，奥田　徹（山梨大・ワイン研）
3B07p04　口腔，消化管を介するエネルギー代謝調節の解析
14:33 ○萩本政大[1]，成川真隆[1]，中島健一朗[2]，石丸喜朗[3]，朝倉富子[1]，阿部啓子[1,4]（[1]東大院農生科・応生化，[2]生理学研究所，[3]明大農・農化，[4]神奈川県立産業技術総合研究所）
3B07p05　GABA 摂取による疲労感・ストレスの経時的変化および睡眠の質改善効果
14:44 ○中村唱乃，耿　紅敏，山津敦史，坂下真耶，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

p06～p10 発表者の接続時間 14:55～15:05

3B07p06　大豆ペプチドおよびカゼインペプチド経口摂取による脳内カテコールアミン代謝促進作用の比較解析
15:05 ○日野由佳子[1]，小柳歩美[1]，市瀬嵩志[3]，前渕元宏[3]，古屋茂樹[1,2]（[1]九州大農，[2]イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター，[3]不二製油株式会社）
3B07p07　胎児期からのビタミン E 欠乏がマウスの社会性認知能力に及ぼす影響
15:16 ○渡邊　佑[1]，服部達哉[2]，川口真以子[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大農　農化，[2]明治大農　農）
3B07p08　ビール苦味成分イソ α 酸の海馬ドーパミンを介した記憶学習機能改善作用
15:27 ○阿野泰久[1]，星　朱香[2]，内田真一[3]，山田浩司[3]，近藤恵二[1]（[1]キリン㈱健康研，[2]キリン㈱基盤研，[3]協和発酵キリン㈱中枢神経研）
3B07p09　紅茶ポリフェノール成分テアフラビンによる抗不安作用
15:38 ○喜多真弘[1]，内田真一[2]，谷口慈将[3]，山田浩司[2]，阿野泰久[1]（[1]キリン株式会社健康技術研究所，[2]協和発酵キリン株式会社中枢神経研究所，[3]キリン株式会社基盤技術研究所）
3B07p10　アンセリンのアルツハイマー病モデルマウスにおける記憶機能改善作用
15:49 ○榎本皓太，金子　順，塩谷秋子，久恒辰博（東大新領域）

B08 会場　午前の部（9:00～12:05）

食品―食品化学 - タンパク質，アミノ酸―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

3B08a01　小麦粉生地物性とグルテニンマクロポリマーについて
9:00 ○野崎聡美（㈱日清製粉グループ本社）
3B08a02　組換え大腸菌による小麦 LOX の生産とそのグルテニン構成変化機構の解明
9:11 ○白石　玲[1]，浅水一久[1]，菅原紘貴[3]，佐藤甫之[1]，今村未央[2]，夏目　亮[2]，椎葉　究[1]，谷川　翼[2]（[1]東京電機大学大学院理工学研究科，[2]東京電機大学大学院工学研究科，[3]東京電機大学理工学部）
3B08a03　水溶性小麦グリアジンの陽イオン交換樹脂による脱アミド化
9:22 ○中村華恵[1]，落合澄香[1]，阿部竜典[1]，山口勇将[1]，赤尾　真[1]，熊谷　仁[2]，裏出令子[3]，熊谷日登美[1]（[1]日大・生資科，[2]共立女子・家政，[3]京大・農）
3B08a04　グリアジンのナノ凝集体構造に対する塩の作用
9:33 ○東野ゆうき[1]，佐藤信浩[2]，杉山正明[2]，清水　祥[1]，大原英之[1]，裏出令子[1]（[1]京大院農，[2]京大原子炉）
3B08a05　グリアジン分子種がグリアジンの性質および小麦粉生地特性に与える効果
9:44 ○浜川旺久[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

3B08a06　カルボキシメチルセルロースとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変
10:05 ○米田真以子，菅村茉莉佳，好田　正，服部　誠（東農工大農）
3B08a07　ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変
10:16 ○影山　廉，好田　正，服部　誠（東農工大農）
3B08a08　甘酒中のレジスタントプロテインに関する研究
10:27 長江達樹[1]，中田彩愛[1]，○川合史晃[2]，見屋井大輔[2]，中村雅彦[2]，尾関健二[1]（[1]金沢工大バイオ・化学，[2]厚生産業㈱）
3B08a09　クロマグロ（*Thunnus orientalis*）皮コラーゲンの抽出と特性解析
10:38 ○田中照佳[1,2]，　髙橋賢次[1]，　平田舞花[1]，　山本恵子[1]，ビッシャシュアマル[3]，　森山達哉[1]，　河村幸雄[1,4]（[1]近畿大院・応生化，[2]福島県立医大，[3]近畿大・水産研，[4]京都女子大）
3B08a10　鶏の胚における卵白タンパク質 OVAX の局在
10:49 ○赤澤隆志[1]，　野々村直樹[2]，　佐藤加奈恵[2]，　小川雅廣[2]，早川　茂[2]（[1]愛媛大院農，[2]香川大農）

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

3B08a11　ヨーグルトカードにおける熱変性度の異なる WPI の添加効果と κ-カゼイン脱離との関係
11:10 ○岡　大貴[1]，野口智弘[1]，玉置祥二郎[2]，内田俊昭[2]，髙野克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]雪印メグミルク㈱，[3]東京農大応生・化学）

3B08a12　ループ領域がソーマチンの甘味，熱安定性に与える影響
11:21　○光本麻佑子，三上文三，谷　史人，桝田哲哉　（京大院農）
3B08a13　X 線小角散乱による大豆タンパク質の凝固過程の追跡
11:32　○佐藤信浩[1]，　東野ゆうき[2]，　守島　健[1]，　井上倫太郎[1]，杉山正明[1]，裏出令子[2]　（[1]京大原子炉，[2]京大院農）
3B08a14　米アルブミンの熱安定性とそのメカニズム
11:43　○濱田　彩[1]，藤澤　望[1]，稲　成信[1]，秋間彩香[2]，山口勇将[1]，赤尾　真[1]，熊谷　仁[2]，熊谷日登美[1]　（[1]日大・生資科，[2]共立女子・家政）
3B08a15　製麺中における SS 結合形成に対する PDI の影響について
11:54　○山田大地[1]，野口智弘[2]，岡　大貴[2]，高野克己[3]　（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

B08 会場　午後の部（14:00〜15:49）

食品―食品化学 - タンパク質，アミノ酸―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B08p01　LC-MS/MS を用いたキラルメタボローム分析法の開発と食品分析への応用
14:00　○中野洋介，谷口百優，福崎英一郎　（阪大院・工）
3B08p02　Analyzing the molecular mechanism of inhibition of bovine norovirus infection by bovine lactoferrin
14:11　○Chaoyue HU[1]，Tomoki SHOJIMA[1]，Yukie KATAYAMA[1]，Michio SUZUKI[1]，Hiroshi KAWAKAMI[2]，Koji NAGATA[1]　（[1]The Univ. of Tokyo，[2]Kyoritsu Women's Univ.）
3B08p03　ロタウイルス増殖抑制活性を示す牛乳ラクトフォリンの分子基盤
14:22　○遠藤江美[1]，大野翔平[1]，小林純子[2]，山田佳太[3]，中川智行[1]，矢部富雄[1]，鈴木　徹[1]，中込とよ子[4]，中込　治[4]，稲垣瑞穂[1]　（[1]岐阜大応用生物，[2]北大学院医，[3]大阪大谷大薬，[4]長崎大院医歯薬）
3B08p04　講演取消
3B08p05　似て非なる二種のタイプ 3 銅タンパク質・フェノールオキシダーゼとヘモシアニン
14:44　○増田太郎[1]，河内達暉[1]，的場康幸[2]，豊原治彦[1]，三上文三[1]（[1]京大院農，[2]広大院薬）

p06〜p09 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B08p06　小麦 LOX アイソザイムの発現，精製，特性評価
15:05　○谷川　翼[1]，佐藤甫之[4]，今村未央[2]，白石　玲[4]，菅原紘貴[3]，夏目　亮[2]，椎葉　究[4]　（[1]東電大・工，[2]東電大・院・工，[3]東電大・理工，[4]東電大・院・理工）
3B08p07　碁石茶製造工程における環状ジペプチド生成機構の解明
15:16　○大塚祐季[1]，山本憲司[1,2]，有田　光[1]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[3]　（[1]高知大・農，　[2]サントリーグローバルイノベーションセンター㈱，[3]高知大・地域セ）
3B08p08　市販魚醤の製法による含有成分の差異
15:27　○日高宗明[1]，向井文二[1]，西田優友[1]，菊池　恭[1]，磯田勇樹[2]，寺田央子[1]，鈴木彰人[1]　（[1]九州保健福祉大学，[2]いそ田）
3B08p09　シイタケに含まれるレンチニン酸の分析
15:38　○藤澤　望，中条早紀，營田雄大，権守千晴，山口勇将，大槻　崇，赤尾　真，松藤　寛，熊谷日登美　（日大・生資科）

B09 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品工学 - 製造工学・加工学―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B09a01　「超高温短時間殺菌」と「脂肪粒径の低下」を組み合わせたヨーグルト新製法の開発
9:00　○市村武文，長田　堯，髙井めぐみ，米倉久美子，高木奈緒，市場智子，堀内啓史　（株式会社 明治）
3B09a02　脂肪粒径の異なるヨーグルトの食感の解析〜構造・物性相関のメカニズムの解明〜
9:11　○日下　舞[1]，　河原井紹博[2]，　市村武文[3]，　高井めぐみ[3]，中村　卓[2]　（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・農化，[3]㈱明治）
3B09a03　恒温定速湿度条件下による澱粉被覆フレーバー粉末からのフレーバーの徐放挙動
9:22　○高重至成[1]，四日洋和[2]，安達修二[2]，吉井英文[3]　（[1]愛大院農，[2]京学大バイオ，[3]香大農）
3B09a04　「焦がしもろみ製法」による芋焼酎の製造およびその条件の最適化
9:33　○滝沢隆一[1]，石原武雄[2]，潮井　徹[1]　（[1]サッポロビール株式会社，[2]サッポロホールディングス株式会社）
3B09a05　ウメ未熟果加工時の成分変化に対する中高圧処理の影響
9:44　○藤田なるみ[1]，藤田智之[1]，武井義之[2]　（[1]信州大院総合理工，[2]ジーエルサイエンス㈱）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B09a06　日本酒の界面前進凍結濃縮
10:05　○宮脇長人[1]，表　千晶[2]，小柳　喬[2]，笹木哲也[3]，武　春美[3]，松田　章[3]，北野　滋[4]　（[1]東京海洋大食品，[2]石川県大生資環，[3]石川県工試，[4]明和工業）
3B09a07　交流高電界加熱による甘酒の高品質殺菌
10:16　○筒井達也[1]，高橋千栄子[2]，金房純代[2]，植村邦彦[2]　（[1]栃木県産業技術センター，[2]農研機構）
3B09a08　高耐熱性ロングライフ卵黄液の調製とその応用
10:27　○藤新令奈[1]，中村朱里[2]，八田　一[1]，乗船沙紀[3]，豊増敏久[3]（[1]京女大院家政，[2]京女大家政，[3]天野エンザイム株式会社）
3B09a09　米麹の堆積培養における培養器内の環境が培養状態に及ぼす影響
10:38　○谷野有佳[1]，下山力生[1]，伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]　（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）
3B09a10　Minimum Heating Pasteurization of Watermelon Puree using High Electric Field Alternating Current
10:49　○Hataichanok KANTRONG[1,2]，Sumiyo KANAFUSA[2]，Chieko TAKAHASHI[2]，Kunihiko UEMURA[2]　（[1]Department of Food Processing and Preservation, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, [2]Advanced Food Technology Unit, Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO)）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B09a11　マイクロ波加熱米糠スフェロゾームの挙動
11:10　○市村怜佳[1]，奥西智哉[2]，岡留博司[2]，五月女格[2]，安藤泰雅[2]，矢野友啓[1]　（[1]東洋大学，[2]農研機構・食品研）
3B09a12　中高圧処理によって得られる高圧加工米の機能性成分および物性の評価
11:21　○佐藤　翼[1]，田中愼太郎[1]，前川亜希[2]，宮永　賢[2]，植田　豊[2]，春日重光[1,2]，　織井孝治[2]，　井上直人[1,2]，　藤田智之[1,2]　（[1]信州大院総合理工，[2]信州大農）
3B09a13　米粉の保管に伴う品質変化挙動
11:32　○山田昌治，本間隆広，藤理沙子，飯高　和，杉山健二郎（工学院大先進工）
3B09a14　大麦 β アミラーゼは麦飯炊飯中に米粒内にも移行する
11:43　○大倉哲也[1]，佐野杏奈[2]，露久保美夏[2]，馬橋由佳[2]，村上（山口）友貴絵[3]，成田宏史[4]，香西みどり[2]　（[1]農研機構食研，[2]お茶大人間創成，[3]京都栄養医療専門校，[4]京都女子大食物）
3B09a15　冷蔵保存中におけるデンプンの老化度の評価およびその抑制法
11:54　○大川　陽[1]，藤澤　望[1]，竹内悠人[1]，脇枝里子[2]，深石光男[2]，秋間彩香[3]，山口勇将[1]，赤尾　真[1]，熊谷日登美[1]，熊谷　仁[3]　（[1]日大・生資科，[2]大塚薬品工業㈱，[3]共立女子・家政）

B09 会場　午後の部（14:00〜15:49）

食品―食品工学 - 製造工学・加工学―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B09p01　精製コンニャクグルコマンナンゾルのアセチル化度が冷凍劣化に及ぼす影響
14:00　○宝門祐樹，勝野那嘉子，西津貴久　（岐阜大院）

3B09p02　クリの低温貯蔵による栗きんとんの物性変化
14:11　○町田有紀[1]，勝野那嘉子[1]，水谷恵梨[2]，西津貴久[1]，加島隆洋[2]（[1]岐阜大学，[2]岐阜県産業技術センター）

3B09p03　クッキー保管中の割れに関する研究
14:22　○長谷川紘平[1]，中原　仁[2]，岩朝義弘[2]，川口智治[2]，西津貴久[1]（[1]岐阜大学，[2]森永製菓株式会社）

3B09p04　リン含量の異なる馬鈴薯澱粉の酵素分解性に及ぼす多糖類の影響
14:33　○佐々木朋子　（農研機構）

3B09p05　**Effect of different humidities on the release rate constant of 1-methylcyclopropene coated paper**
14:44　○HERMAWAN DWI ARIYANTO[1], HIDEFUMI YOSHII[2]（[1]Department of Applied Bioresource Science, Ehime University, [2]Department of Applied Biological Science, Kagawa University）

p06〜p09 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B09p06　亜臨界水中でのグルコース濃度が異性化反応に及ぼす影響
15:05　○平山祐輔[1]，小林　敬[2]，谷　史人[2]　（[1]京大農，[2]京大院農）

3B09p07　プロテオグリカンを用いた妙丹柿の渋戻り抑制加工法の検討
15:16　○田中早紀，山本　歩　（八戸高専）

3B09p08　北海道産小豆粉の製造方法と利用に関する研究
15:27　○渡辺　治　（道総研食加研）

3B09p09　イオン性及び非イオン性界面活性剤を用いた大豆油の乳化における粒子径分布の温度依存性
15:38　内河聡太郎，○島　元啓　（石川県立大学）

講演番号：2A01a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A01 会場

新素材キチンナノファイバーを用いた選択的寄生菌分離法の確立

Selective isolation method for Clavicipitalean fungi using chitin nanofiber

○岩﨑 弘夢[1]、野中 健一[1,2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研)
○HIROMU IWASAKI[1], KENICHI NONAKA[1,2] ([1]Kitasato Univ., [2]Kitasato institute for life sciences)

【背景と目的】

バッカクキン科糸状菌は進化の過程で界を超えた宿主転換が行われており、本科に属する寄生菌類の宿主は昆虫、線虫、菌類と多岐に渡る。本科寄生菌類は宿主に感染する過程で、宿主免疫機構を突破・感染するために神経撹乱物質や免疫抑制物質等の物質を産出することが報告されている。これまでに寄生菌類からはシクロスポリンやセファロスポリン等の医薬品が発見されており、当研究グループにおいても寄生菌類から多くの新規化合物を発見している。また、これら寄生菌類は宿主に特異的に感染し、宿主以外の他生物へ低影響である特性から微生物農薬として世界的に広く使用されている。従って、これら寄生菌類は医薬品や農薬等の探索源として極めて重要な役割を果たしている。

寄生菌類は普段、主に土壌中に生息しているが土壌から寄生菌のみを網羅的かつ選択的に分離する方法は未だに確立されていない。それ故に、従来の方法ではランダムに分離した糸状菌から寄生菌類を絞り込まなくてはならず膨大な費用と時間を要する。そこで、本研究ではこの問題を打破する革新的な寄生菌分離法の確立を目的とした。

演者は選択的な寄生菌類の分離を行うために、宿主の構成成分に着目した。昆虫の表皮、線虫の卵の表皮、菌類の細胞壁は構成成分に共通してキチン質を含んでおり、これらの寄生菌はいずれもキチン分解能を有しているため宿主体内に侵入、感染することができる。本研究では、これら寄生菌に共通したキチン分解能に着目し選択的寄生菌分離を目指した。

【方法と結果】

本研究ではキチンを主成分とした培地を作成し、キチン質分解で生じたハロを指標とすることで選択的寄生菌分離を試みた。まず、培地に使用するキチン質の素材（キチン粉末と新素材キチンナノファイバーの 2 種）とキチン質濃度によるハロ形成への影響を検討した。検討の結果、1.0%キチンナノファイバー培地が最もハロの鮮明度が高く、本培地を選択的寄生菌分離培地として採用した。次に本培地を用いて、神奈川県にて採取した土壌から糸状菌の分離を行なった。また、寄生菌分離選択性を検討するために糸状菌の一般的な分離培地である PDA 培地においても同様の実験を行った。全分離株に占める寄生菌類の割合を比較した結果、PDA 培地では約 1 割であるのに対し、本培地では約 5 割と大幅な分離率向上に成功した。

Chitin nanofiber, Isolation method, Clavicipitaceae

講演番号：2A01a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A01 会場

コレステロール分解性あるいは吸収性をもつ真菌の探索

Searching for fungi possessing cholesterol-degrading or -absorbing properties

○小池 優[1]、橋床 泰之[2] ([1]北海道大学農学部、[2]北海道大学大学院農学院)
○Yu KOIKE[1], Yasuyuki HASHIDOKO[2] ([1]Hokkaido University school of agriculture, [2]Hokkaido University graduate school of agriculture)

【背景・目的】コレステロールはステロイド生合成経路における出発物質であり、多くの動物で様々な生命現象に関わっている。人体内におけるコレステロール過剰はアテローム性動脈硬化や胆石の原因となるため、脊椎動物ではこれを胆汁酸塩として体外に排出している。したがって、これらを *in vitro* で効率よく分解あるいは除去できる微生物を環境中に探索し、血中コレステロールの分解・除去に関わる因子を取得する試みは、高コレステロール血症の応急的対処法の開発においても重要なアプローチである。一方、製薬業界においてもステロイド系薬剤原料の調製手段として、微生物により得られるコレステロール代謝産物が注目されている。コレステロールを代謝分解する真正細菌は多数報告されているが、菌体の固定化が容易な真菌によるコレステロール分解・除去についての報告はほとんどない。本研究では、高いコレステロール分解・除去能をもつ真菌の探索を試み、得られた菌株について種の同定とコレステロール分解・除去のメカニズム解明を目的とした。

[**方法・結果**] コレステロール分解・除去真菌の探索を行うため、トリテルペン類が多く供給されていると予想される野外、特にシラカンバ朽ち木樹皮や分解途上キノコ類の周辺土壌のサンプリングを行い、分離源として使用した。熱アセトンに溶解したコレステロールを固化前の PDA に混合して調製した 1.0 g コレステロール/L 懸濁寒天平板を用い、ここに分離源（176 種のサンプルを、集積培養等、いくつかの処理に供して得た合計 518 種類の接種源）各 10 mg を 10 ml Milli-Q 水に懸濁し、調製した懸濁液上清 100 µL をこのコレステロール懸濁済み PDA 培地に塗布後、15℃で培養し、コレステロール分解・除去能を示す真菌をスクリーニングした。その結果、2017 年 5 月上旬に北海道大学構内で出現していた半分解状ヒトヨタケ(*Coprinopsis atramentaria*)子実体の直下土壌として採取したサンプルから黒色コロニーを形成する優占真菌が、そのコロニー周辺でコレステロール粒を可溶化・消去していたため、この真菌純粋分離し、ITS 領域塩基配列のホモロジー検索から *Leptodontidium* sp. と同定した。この分離真菌株を 0.1 g/L コレステロール入り Winogradsky’s 液体培地に接種し震盪培養を行ったところ、菌糸増殖に伴ってコレステロールによる培地の白濁が消失し始め、培養 8 日目までに完全な無色透明になり、培養液上清からはコレステロールが全く検出されなくなった。これに対し、培養後菌体を有機溶媒で抽出したところ、添加相当量のコレステロールを回収できたため，培地からのコレステロール除去が当該真菌菌体への特異的吸着による可能性を検討している。

Cholesterol-degrading fungus, Cholesterol adsorption, *Leptodontidium* sp.

講演番号：2A01a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A01 会場

高濃度二酸化炭素で良好に生育する Micractinium 属微細藻類の分類

Isolation of high-level-CO2 tolerant Micractinium sp. microalgae

○知名 さきえ、藤井 克彦（山口大農）
○Sakie CHINA, Katsuhiko FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】

現在の大気における CO_2 濃度は約 300 ppm であるが、一説によると原子大気では CO_2 は約 30%を占めていたと考えられている。従って、高濃度 CO_2 で生育できる微細藻類は、先祖藻類種が地球に出現した頃の形質を受け継いでいるのかもしれない。他方、各種産業の排気ガスには CO_2 が高濃度で含まれ、火力発電所や鉄工所等の排気ガスには 20－40%程度含まれている。従って、CO_2 の削減および有効利用の観点からも、高濃度 CO_2 で生育できる微細藻類種は大変興味深い。演者らは以前に高濃度 CO_2 で生育できる海産微細藻類 *Picochlorum* 属株を分離し、その性質を研究してきた。本研究では淡水を探索源として、高濃度 CO_2 で増殖できる微細藻類株の分離を試みた。

【実験方法】

湖沼等から淡水試料を採集し、遠心分離により微生物を含む沈殿を得た。無機塩類培地に沈殿懸濁液を接種し、0.03、20、40、あるいは 100%の CO_2 を充填したガラスバイアルで振とう培養を行った。微細藻類の生育が見られた培養サンプルは集積培養を繰り返した後に寒天培地上に接種し、藻類株の単藻化を行うとともに、得られた株の 18S-rRNA 遺伝子および ITS 領域の DNA 配列決定した。また、0.03、10、20、30、40、50、60、80、100%の CO_2 を充填したガラス容器で藻類株を振とう培養し、CO_2 濃度と生育の関係性を検討した。さらに、藻類株をビーズビータ処理により破砕し、ビタミン含量、アミノ酸組成、脂肪酸組成等を検討した。

【結果】

CO_2 を封入して約 1 ヶ月間集積培養した結果、3 箇所のサンプルのうち、2 つの試料で藻類の生育が見られた。寒天培地上に接種、培養することで 2 株の分離株を得ることができた。18S-rRNA 遺伝子および ITS 領域の DNA 配列を解析した結果、2 株とも *Micractinium* 属であることが明らかとなった。分離株は 2 株とも CO_2 濃度 30%前後にて最も良好な増殖を示し、CO_2 濃度 80%でも空気（0.03% CO_2）よりも良い生育が確認された。*Micractinium* 属の既知種で 30%前後 CO_2 で最も良好に生育する株は知られていない。

分離株の細胞成分を分析したところ、動物の必須ビタミンおよび必須アミノ酸の多くが含まれており、不飽和脂肪酸も多く含まれることが確認された。これらの結果から、分離株は食料あるいは飼料・餌料としての産業利用に適した性質を持つ可能性が示唆された。

Micractinium, microalgae, CO2-tolerant

講演番号：2A01a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A01 会場

好熱好アルカリ性 Geobacillus toebii OIT60-9-2 株を宿主とするウイルスφIN1 の分離・性状解析
Isolation and characterization of virus phi-IN1 infecting thermophic and alkalophilic Geobacillus toebii OIT60-9-2 strain

○渡邊 恭伸[1]、大森 勇門[1]、土居 克実[2]、尾崎 清和[3]、大島 敏久[1] ([1]大阪工大工、[2]九州大農、[3]摂南大薬)
○Yasunobu WATANABE[1], Taketo OHMORI[1], Katsumi DOI[2], Kiyokazu OZAKI[3], Toshihisa OHSHIMA[1] ([1]Osaka Inst. Tech., [2]Kyushyu Univ., [3]Setsunan Univ.)

【背景・目的】

ウイルスの中で細菌を宿主とするファージとそれ由来の酵素は医療、食品衛生、環境保全、遺伝子工学分野などにおいて有効利用されている。その中で、好熱菌などの特殊環境微生物を宿主とするファージの基礎や応用面での研究例はこれまでのところ極めて少ない。我々は応用面において潜在性の高い好熱菌ファージ由来の酵素の機能解析と応用面の開発を進めるために、本研究では好熱・好アルカリ性ファージの分離と特徴の解明を目的とした。

【方法・結果】

まず、様々な環境中から採取した土壌などの試料を用いて高温、アルカリ条件下（50-80℃、pH 9 付近）で宿主の好熱好アルカリ性菌の分離を行った。その後、それを宿主とするバクテリオファージは、同じ培養条件下での二重寒天法を用いファージによるプラーク形成を目安に分離を行った。その結果、高温、アルカリ条件下で発酵生産される天然の「スクモ藍」から 60℃, pH 9 の培養条件下で、単独コロニーを形成する好熱好アルカリ性菌を分離した。分離した好熱菌は 16S rDNA の塩基配列の相同性解析から、好アルカリ性の *Geobacillus toebii*（OIT60-9-2 株, 基準株との相同性 99.7%）と同定できた。この、*G. toebii* OIT60-9-2 株を宿主とし、環境試料から二重寒天重層法を用いてプラーク形成するファージφIN1 を兵庫県・猪名川の土壌試料より得た。このファージ感染宿主菌を液体培養後フィルターろ過（φ0.45μm）して宿主を除去したファージφIN1 液を作成し、ファージφIN1 生存に対する温度と pH の影響を調べた。その結果、ファージφIN1 は 55℃までは約 70%、60℃では 40%の感染性を示し、ファージは好熱性を示すことが判明した。また pH の影響では pH 5～9 の範囲内で 40%以上の残存感染率を示した。これらの結果からファージφIN1 は好熱・好アルカリ性を示すが、宿主と共存する場合（培養温度 60℃）と比較すると、耐性が低下することが分かった。次に、ファージφIN1 は透過型電子顕微鏡観察から正二十面体構造をとり報告例の少ない形態をとることが分かった。以上の結果から、新規な好熱・好アルカリ性菌ファージの分離に成功した。現在、さらにファージφIN1 の遺伝子解析と宿主菌のゲノム解析を進めている。

thermophilic bacteriophage, thermophile, Geobacillus toebii

発表責任者：渡邊恭伸（d1d17u01@oit.ac.jp）

講演番号：2A01a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A01 会場

発酵現場より単離した乳酸球菌ファージ Q1 の特性およびゲノム解析

Characterization and genome analysis of *Lactococcus* phage Q1 isolated from lactic acid fermentation plant

○山迫 彩華[1]、サンソントトマス シリンシオン[2]、藤野 泰寛[1,3]、土居 克実[1,3]([1]九大院・生資環、[2]シーナカリンウィロート大・理、[3]九大・農)
○ Ayaka YAMASAKO[1], Sirinthorn SUNTHORNTHUMMAS[2], Yasuhiro FUJINO[1,3], Katsumi DOI[1,3] ([1]Grad. Sch. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Fac. Sci., Srinakharin wirot Univ., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】

バクテリオファージ（ファージ）は細菌に感染するウイルスの総称である。ファージはベクターなどの遺伝子工学ツールや、リガーゼなど産業用酵素のソースとしての利用が期待される一方、発酵過程での混入による生産の遅延や製品の品質低下といった問題を引き起こす。このようなファージの混入による被害は、世界中の発酵食品生産現場において報告されている。本研究では乳酸発酵食品の生産に重要な乳酸球菌に感染するファージを単離し、その性状、およびゲノム構造について解析することを目的とした。

【方法および結果】

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* Q1 株を指示菌とし、乳酸発酵の現場より単離したファージ Q1 を二重寒天法により単離したところ、直径 1 mm のクリアプラークが形成された。次に、TEM によるファージの形態観察を行ったところ、ファージ Q1 は直径約 69 nm の正二十面体様の頭部をもち、全長が約 228 nm、幅が約 16 nm の非収縮性の尾部を有しており、*Siphoviridae* 科に分類された。また、ファージ Q1 の宿主域を検討したところ、本ファージは *L. lactis* subsp. *cremoris* Q1 株及びそのプラスミドキュアリング株である Q4 株にのみ感染し、狭い宿主域を示した。また、Q4 株を用いて一段増殖曲線を作成したところ、ファージ Q1 の潜伏期は 30 分で、バーストサイズは 80 PFU/infected cell であった。ファージ Q1 を 4－70℃の各温度に 15 分間曝露した後の生存率を二重寒天法によって測定した結果、本ファージは 4～40 ℃で 90%以上の生存率を示したが、50℃の加熱によって生存率は 60%に低下した。さらに 60 ℃以上の加熱では、プラークは形成されなかった。同様に、ファージ Q1 の各 pH における 24 時間後の生存率は、pH5～9 では 80%以上であったが、pH3 と pH11 において、ファージ Q1 はプラーク形成能を失った。さらに、ファージ Q1 の薬剤（Virkon、Dettol、 Decon、エタノール、 次亜塩素酸ナトリウム、アロンクリン、サラファイン）に対する耐性を、ファージ生存率が 1%以下に減少する時間(T_{99})を測定することで評価した。その結果、T_{99} が 30 分以下の薬剤は 2% Virkon、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウム、100 ppm アロンクリン、70 ppm サラファインであった。一方、5% Dettol、5% Decon、75% エタノール処理では T_{99} が 30 分以上だった。ファージ粒子を塩化セシウム密度勾配超遠心分離法によって精製し、ゲノム DNA を抽出して、ファージ Q1 のゲノム構造解析を行っている。

bacteriophage, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* , lactic acid fermentation

講演番号：2A01a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A01 会場

酵素を用いた D-アスパラギン酸高生産乳酸菌探索法の開発

Development of an enzymatic isolation method of highly D-aspartic acid-producing lactic acid bacteria

○梶谷 賢吾、高橋 祥司、阿部 勝正、解良 芳夫（長岡技科大・生物）
○Kengo KAJITANI, Shouji TAKAHASHI, Kastumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】D-アミノ酸は細菌細胞壁の構成成分として機能していることが古くから知られているが，動物では生体外異物として長年考えられていた．しかし近年，D-アミノ酸が種々の動物に見いだされ，多様な生理機能を発揮していることが明らかとなってきた．D-Asp は，神経伝達や統合失調症に関連する行動に影響を与えることが示され，統合失調症治療における抗精神病薬との併用効果が期待されている．また，ヒト皮膚の角層に存在する D-Asp の量が加齢とともに減少すること，D-Asp が肌のハリに重要な真皮コラーゲン繊維束の形成を促進する効果が報告されている．また，動物において D-Asp 経口摂取による精子運動性能の向上も報告されている．細菌が生産する主要な D-アミノ酸は D-Ala と D-Glu であるが, 乳酸菌ではラセマーゼにより D-Asp が生産されることが知られている．乳酸菌はプロバイオティクスであり，整腸作用，血中コレステロール低減作用，免疫賦活化作用や抗腫瘍作用など様々な生理効果が知られている．したがって，D-Asp を多量に生産する乳酸菌を単離することができれば，D-Asp の生理効果を加えた新たな機能性食品の開発が可能になると考えられる．そこで本研究では，酵素を用いた乳酸菌培地中の D-Asp 定量法を開発し，様々な試料から D-Asp を高濃度で生産する乳酸菌の探索を行った．

【方法・結果】D-Asp の定量には当研究室で見いだした D-Asp に高い特異性を有する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株由来の D-アスパラギン酸オキシダーゼを使用し，反応により生じる H_2O_2 を，西洋ワサビペルオキシダーゼ共存下，カップラーとして 4-アミノアンチピリンを，水素供与体としてフェノールもしくは TOOS とした酸化縮合反応による生じる呈色で検出した．まず，水素供与体としてフェノールを用いた反応系において，0～4 mM の D-Asp 溶液の検出を試みたところ，呈色は濃度依存的な高い直線性を示し，D-Asp の定量が可能であることが分かった．そこで次に，D-Asp の検出に及ぼす培地成分の影響を探るため，乳酸菌の培養で多用される MRS 培地中の D-Asp の検出を試みたところ，低濃度領域おいて若干の呈色低下が観察されたものの，濃度依存的な高い直性線が得られ，検出限界 48 μM および定量限界 144 μM が得られた．また，水素供与体として TOOS を用いた反応系においても MRS 培地中の D-Asp を検出したところ，同様に濃度依存的な高い直線性が得られ，検出限界 24 μM および定量限界 73 μM が得られ，フェノールを用いた場合よりも高感度に培地中の D-Asp を検出できることが分かった．現在，様々な試料より乳酸菌を単離し，本法を用いて D-Asp を多量に生産する乳酸菌の探索を行っている．

lactic acid bacteria, D-aspartate, D-aspartate oxidase

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2A01a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A01 会場

Firmicutes 門細菌における新規な C30 カロテノイド生産株の探索

Isolation of bacterial strains synthesizing novel C30 carotenoids from phylum Firmicutes

○小柳 喬[1]、眞岡 孝至[2]、越野 雅人[1]、持永 彩花[1]、長尾 美帆[1]、新藤 一敏[3]、三沢 典彦[4] ([1]石川県大・食品、[2]生産開発研、[3]日本女子大・家政、[4]石川県大・資源研)
○Takashi KOYANAGI[1], Takashi MAOKA[2], Masato KOSHINO[1], Ayaka MOCHINAGA[1], Miho NAGAO[1], Kazutoshi SHINDO[3], Norihiko MISAWA[4] ([1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Res. Inst. Prod. Dev., [3]Fac. Hum. Sci. Design, Japan Women's Univ., [4]Res. Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

＜目的＞カロテノイドは動物、植物、微生物に広く分布し、その中でも Firmicutes 門に属するグラム陽性細菌においては、炭素数 30 の基本骨格を持つ色素（C30 カロテノイド）を合成する株が存在する。一般的な C40 カロテノイドが 700 種以上単離されているのに対して、C30 カロテノイド単離の報告数は乏しい。本研究では、Firmicutes 門細菌群から新規な C30 カロテノイドを見出すことを目的として、産生株のスクリーニングを行った。カロテノイド産生細菌の分離源として、発酵食品およびアキアカネ（赤とんぼ）腸内細菌に着目した。
＜方法＞石川県産発酵食品（かぶらずし、あじなれずし、および山廃酒母等）由来乳酸菌群を de Man Rogosa and Sharpe (MRS) 寒天培地上に植菌し、集落の黄変を観察しカロテノイド産生候補株の選抜を行った。また、アキアカネ腸内細菌については、糞を採取し滅菌生理食塩水にて希釈のうえ、6 種類の寒天培地 (ポテトデキストロース寒天、MRS 寒天、Gifu Anaerobe Medium 寒天、トリプトソイ寒天、普通寒天、および標準寒天) に塗抹し、黄・赤変集落を選抜した。各分離株について 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) 塩基配列解析により菌種を同定し、UPLC、^{1}H-NMR、および質量分析によるカロテノイド性状解析に供した。
＜結果および考察＞
石川県産発酵食品由来乳酸菌群より、最も顕著な集落の黄変を示した菌株として *Lactobacillus plantarum* 1 株を選抜した。本菌種は C30 カロテノイド (4,4’-diaponeurosporene) を産生することが既に報告されているが、菌体抽出物を調製し UPLC および紫外可視吸収スペクトル解析に供したところ、本化合物よりも吸収極大が短波長側 (380, 401, 425 nm) にシフトした未同定の誘導体と考えられるカロテノイドが存在することが示唆された。また、アキアカネ糞由来細菌群において集落の黄変を示した 18 株について、純粋培養のうえ菌種同定を行った結果、カロテノイド産生候補株として *Kurthia gibsonii* が得られた。本菌株の保持するカロテノイドを UPLC 解析に供したところ、いずれも 426, 453, 486 nm に吸収ピークを有する 3 種類の化合物の存在が予測された。本物質群は、同一のカロテノイド骨格に 3 種の脂肪酸がエステル結合した化合物であると推定された。上記カロテノイド群は最終構造決定には至っていないものの、Firmicutes 門細菌の有する新規 C30 カロテノイドである可能性が高いと考えている。

carotenoid, Fermicutes

発表責任者：小柳喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A01a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A01 会場

ピルビン酸や 3 ヒドロキシ酪酸を産生するハロモナス菌の分離
Isolation of *Halomonas* Producing Pyruvate and 3-Hydroxybutyrate

○辻 彩花[1]、木地 翼[2]、半田 瞳[2]、東 慶直[1,2] ([1]近畿大学大学院生物理工学研究科、[2]近畿大学生物理工学部)
○Ayaka TSUJI[1], Tsubasa KIJI[2], Hitomi HANDA[2], Yoshinao AZUMA[1,2] ([1]Graduate School of BOST, Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

ハロモナス菌(*Halomonas*)は海や塩濃度の高い湖からよく単離されており、今日では 82 の標準株が報告されている。塩濃度の高いアルカリ性の培地で増殖できるため、滅菌操作なしに純粋培養が可能であり、工業的物質生産には適した菌である。バイオプラスチックの材料であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)の高い蓄積量を特徴とする株や、ピルビン酸や 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)を産生する株も報告されている。ピルビン酸は医薬品や化粧品の製造などファインケミカルの重要な中間体で、アメリカでは持久力を高めるアスリート用のサプリメントとしても販売されている。3HB はバイオポリマー合成の基質となるだけではなく、脂肪を分解して産生される 3HB は乳幼児や飢餓時の栄養源となる。さらに、動脈硬化予防やがんの治療にも有望視されている物質で、様々な生理活性を持つことから医薬品への応用も期待されている。本研究では、高塩濃度となる梅干しの調味液に注目し、微生物発酵による有用物質の工業生産を目指してピルビン酸や 3HB を高濃度に産生するハロモナス菌の分離を試みた。まず、微生物のパイロット的単離試験として、梅干し加工工場でまさに梅干しを浸漬している調味液、梅干し加工工場から廃棄された使用済み梅調味液、使用済み梅調味液の排水処理施設の梅干し残渣や活性汚泥から微生物の分離を試みた。複数種類の培地を用いて約 60 コロニー単離した。16S rRNA 遺伝子の DNA 配列の解析から、高塩濃度・高 pH の培地で増殖した菌の内 8 菌がハロモナス菌に分類されることが明らかになった。いずれもついても完全に一致する配列が報告されていない新規な株であった。また、単離した 8 菌とハロモナス菌 82 標準株の 16S rRNA 遺伝子の DNA 配列をもとに分子系統樹解析を行うと、単離したハロモナス菌はハロモナスの多様なクレードに属することがわかった。これらの 8 菌の性状や物質生産能を解析した結果、2 菌がピルビン酸を産生し、3 菌が PHB を高蓄積し、PHB を高蓄積した 3 菌を含む 5 菌が 3HB を産生した。硝酸塩の濃度がピルビン酸生産に関連するとの報告に従い、分離 8 菌について異なる硝酸塩濃度の条件下でピルビン酸産生を調べたところ、3-4%の硝酸塩を含む培地で分離菌 A024 が 6%程度のピルビン酸を産生した。今後は工業生産に向けてさらなる培養条件の検討を行っていくとともに、硝酸代謝とピルビン酸産生の関係を明らかにしていきたい。また、食品への応用を目指して、食経験のあるハロモナス菌の単離を試みていく。

Halomonas, pyruvate, 3-hydroxybutyrate

講演番号：2A01a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A01 会場

MALDI-TOF MS を用いたプロテオタイピングによる *Salmonella enterica* の血清型識別
Proteotyping of *Salmonella enterica* strains at serotype level by MALDI-TOF MS

○加藤 晃代[1]、山本 奈保美[1]、永井 里美[1]、島 圭介[2]、秋山 由美[3]、太田 順司[4]、田村 廣人[1]([1]名城大農、[2]（株）島津製作所、[3]兵庫県立健康生活科学研究所、[4]一般財団法人日本食品分析センター)
○Teruyo KATO[1], Naomi YAMAMOTO[1], Satomi NAGAI[1], Keisuke SHIMA[2], Yumi AKIYAMA[3], Junji OTA[4], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijo Univ., [2]Shimadzu co., [3]Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, [4]Japan Food Research Laboratories)

【背景と目的】マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いた微生物同定法は、簡便かつ迅速であるため、従来の 16S rRNA 配列解析に代わる強力な手法として注目されている。しかし、従来の MALDI-TOF MS フィンガープリント法では血清型や株レベルでの識別は、困難であった。そこで、本研究では、食中毒細菌サルモネラ菌（*Salmonella enterica* subsp. *enterica*）の野外単離株を用いて、血清型や株レベルでの識別が可能である *S10*-GERMS 法※および当該法に準じたプロテオタイピングが可能なソフトウェア Strain Solution Ver.2 による血清型識別能を検証した。

【材料と方法】コロニーダイレクト MALDI-TOF MS において *S. enterica* の血清型識別に使用可能なバイオマーカーピークを探索し、それらのシーケンス解析と MALDI-TOF MS による実測値に基づき理論質量表を構築した。これを Strain Solution Ver.2 のデータベースとして登録し、カルチャーコレクション及び野外より入手・単離した *S. enterica* 計 116 株を識別可能か検証した。

【結果】*S. enterica* の血清型識別に有用な計 12 本のバイオマーカーを見出した[2]。これらの理論質量を Strain Solution Ver.2 に登録し 116 株を分析した結果、食中毒の主要なアウトブレイク血清である Enteritidis、Typhimurium、Infantis を含む 109 株（94%）を正しくプロテオタイピングすることができた。

※*S10*-GERMS 法[1]（*S10-spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum）：ゲノミクスとプロテオミクスを融合したプロテオタイピング法。MALDI-TOF MS 等により検出されるタンパク質成分をバイオマーカーとして微生物の識別を行う。

【参考文献】

［1］Hotta et al., *J Proteome Res*, 9, 6722(2010)
［2］Ojima-Kato et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 1(2017)

MALDI-TOF MS, Salmonella enterica, Proteotyping

講演番号：2A01a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A01 会場

微生物腐食対策のための金属腐食性 *Prolixibacter* 属細菌検出系の構築

Evaluation of PCR primers of 16S rRNA gene for the detection of iron-corroding *Prolixibacter*.

○飯野 隆夫[1]、伊藤 公夫[2]、大熊 盛也[1] ([1]理研 BRC-JCM、[2]新日鐵住金)
○Takao Iino[1], Ito Kimio[2], Ohkuma Moriya[1] ([1]RIKEN BRC-JCM, [2]Nippon Steel and Sumitomo Metal Corp.)

【目的】微生物作用により金属材料が腐食する微生物腐食は、予測が困難な上、急速かつ局所的に腐食が生じるため、金属腐食問題の中でも特に問題が深刻化しており、原因菌の特定や効果的な防食対策が喫緊に求められている。この問題に対して、我々は未知種であった *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 株が既存のメカニズムとは異なり、硝酸還元を介して金属腐食を引き起こすことを明らかにした[1)]。微生物腐食を未然に防ぐためには、原因菌の種多様性の把握や検出技術の構築が必須であるが、*Prolixibacter* 属細菌は 2 種 2 株しか存在せず知見が皆無である。本研究は、新たな金属腐食性 *Prolixibacter* 属細菌の分離・培養と PCR による *Prolixibacter* 属細菌検出系の構築を目的とした。
【方法】日本各地の原油などを収集し、*Prolixibacter* 属細菌の純粋分離を行った。金属鉄 (Fe^0) を含む人工海水培地に供試菌株を接種し、25°C にて 30 日間培養を行なった。培養後、試験液中の溶出鉄量を定量し、鉄腐食能の有無を解析した。続いて、分離株を含む *Prolixibacter* 属細菌 6 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列のアライメントを行い、*Prolixibacter* 属細菌に特異的なプライマーを作製した。分離株と工場用水から染色体 DNA を抽出し、作製したプライマーを用いて PCR を行った。
【結果および考察】4 株の *Prolixibacter* 属細菌を新たに純粋分離した。16S rRNA 遺伝子塩基配列解析を行った結果、3 株（AT004 株, KGS048 株, NT017 株）は *P. denitrificans* と 99.8-99.2%の高い相同性を得た。残る 1 株（SD074 株）は既知の 2 種と 95.8-97.0 %の相同性しかなく、*Prolixibacter* 属第 3 の種と考えられる。これら分離株のうち、NT017 株を除く 3 株が硝酸塩存在下で金属鉄を腐食した。このことから、*Prolixibacter* 属細菌の金属腐食能は株固有の能力でありながら、種間横断的に保有されることが明らかとなった。*Prolixibacter* 属細菌特異的プライマーを用いて、培養株の DNA を鋳型に PCR を行った結果、*Prolixibacter* 属細菌 6 株全てから単一の遺伝子断片の増幅が確認され、近縁種である *Mangrovibacterium diazotorphicum* JCM 19152^T などからは増幅がなかった。よって、作製したプライマーは *Prolixibacter* 属に特異性が高いことを確認した。工場用水由来の染色体 DNA を鋳型に PCR を行った結果、目的とする単一の遺伝子断片の増幅が確認され、供試した工場用水に *Prolixibacter* 属細菌が存在することが明らかとなった。現在、作製したプライマーセットを利用した定量化に向けた準備を整えている。安価かつ迅速な解析方法である PCR/定量 PCR 解析は原因菌検出および腐食リスク評価を可能にする実現場での定期予防診断技術として期待できる。

1) Iino, T. *et al.* (2015) *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1839.

microbiologically influenced corrosion, iron corrosion, nitrate reduction

発表責任者：飯野隆夫（iino@riken.jp）

講演番号：2A01a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A01 会場

水田土壌より分離した微好気性鉄酸化細菌 *Ferrisolum kumadai* gen. nov., sp. nov.

Ferrisolum kumadai gen. nov., sp. nov., a microaerophilic iron-oxidizing bacterium isolated from a paddy field soil

カァリファ アシュラフ[1,2]、中筋 悠太[3]、坂 紀邦[4]、本庄 弘樹[5]、浅川 晋[6]、○渡邉 健史[6]（[1]サウジアラビア キング・ファイサル大、[2]エジプト ベニ・スエフ大、[3]イチビキ（株）、[4]愛知農総試、[5]愛知県立農業大学校、[6]名古屋大院生命農）
Ashraf Khalifa[1,2], Yuta Nakasuji[3], Norikuni Saka[4], Hiroki Honjo[5], Susumu Asakawa[6], ○Takeshi Watanabe[6] ([1]King Faisal Univ., [2]Beni-Suef Univ., [3]Ichibiki Co., Ltd., [4]Aichi Agric. Res. Cent., [5]Aichi Col. Agric., [6]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

［目的］湛水と落水が繰り返される水田において、鉄の酸化還元状態の変化は土壌中の様々な無機・有機物の挙動に影響を及ぼす。水田土壌中の鉄酸化反応は、これまで非生物的反応が主体であると考えられてきた。しかし演者らは、先行研究において、水田土壌を微好気条件下に置くと土壌表面に鉄酸化物を沈着した微生物コロニーが形成されることを観察し、生物的反応が関与することを見出した。本報告では、鉄酸化物沈着コロニーより分離した微好気性鉄酸化細菌株の形態や生理的、化学分類学的、遺伝的および系統遺伝学的特徴を明らかにし、分類学的検討を行った。
［材料と方法］愛知県安城農業技術センター内の水田圃場より採取した土壌を分離源とした。湛水条件下で前培養した土壌を、二重合成ゴム栓で密閉した試験管内で窒素気相下、25℃、暗所で静置培養した。合成ゴム栓はわずかな酸素透過性を示し、培養に伴い試験管の気相は微好気的な雰囲気に移行する。培養 3、4 週間後に土壌表面に形成された鉄酸化物沈着コロニーを、底に硫化鉄を沈めた軟ノーブル寒天無機塩培地に接種した。酸素と 2 価鉄の対称的な濃度勾配が形成された培地の中で、菌の生育とともに帯状の鉄酸化物が集積した部位を採取し、限界希釈法を繰り返して純化した。得られた An22 株の細胞形態、生理的特性、脂肪酸およびキノン構成種、Rubisco 活性、DNA の G+C 含量および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を明らかにした。
［結果］An22 株はわずかに湾曲した桿状のグラム陰性細菌であり、平均細胞サイズは 0.3×1.4μm であった。細胞は運動性を示し、極鞭毛を有した。生育温度範囲および pH は 12-37℃、pH 5.2-6.8 であり、至適生育条件は 25-30℃、pH 5.9-6.1 であった。An22 株は、微好気条件下で生育する独立栄養性の鉄酸化細菌であり、2 価鉄以外の無機物および有機物をエネルギー源として利用しなかった。Rubisco 活性を有したことからカルビン回路により炭酸固定を行うことが示された。主要な脂肪酸組成およびキノンは、$C_{16:0}$ と $C_{16:1}\omega7c$/ $C_{16:1}\omega6c$ および UQ-10、UQ-8 であり、DNA の G+C 含量は 61.4 mol%であった。これらの特徴は、ベータプロテオバクテリアの *Gallionellaceae* 科の微好気性鉄酸化細菌の特徴と類似していた。16S rRNA 遺伝子の系統解析では、微好気性鉄酸化細菌 *Gallionella ferruginea* および *Ferriphaselus amnicola* OYT1^T に近縁であった。しかし、その相同性は 95%以下であり、An22 株はそれらの菌に特徴的なストーク状の鉄酸化物構造を形成しなかった。DNA の G+C 含量や最高生育温度は An22 株が最も高かった。以上の表現形質、遺伝的、系統遺伝的性質により、An22 株は *Gallionellaceae* 科の新属新種の細菌であると考えられ、新属新種名 *Ferrisolum kumadai* を提案する。

Iron-oxidizing bacteria, Paddy field soil, Microaerophile

発表責任者：渡邉健史（watanabe@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A01a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A01 会場

ゲノム情報に基づいた *Acetobacter* 属酢酸菌群の系統分類に関する一考察
Study on the phylogenetic classification of genus *Acetobacter* based on genomic information.
○小林 ゆかり [1]、石川 森夫 [1]、鈴木 敏弘 [1]、松谷 峰之介 [2]、新村 梨恵 [1]、矢吹 岳 [1]、海野 祥子 [1]、志波 優 [3]、松下 一信 [2]、貝沼(岡本) 章子 [1] ([1] 東京農大・応生科・醸造、[2] 山口大・創成科学、[3] 東京農大・生命・分子微生物)
○Yukari KOBAYASHI[1], Morio ISHIKAWA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Rie NIMURA[1], Gaku YABUKI[1], Shoko UMINO[1], Yuh SHIWA[3], Kazunobu MATSUSHITA[2], Akiko OKAMOTO-KAINUMA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi univ., [3]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌群は食酢醸造に用いられる菌株を包含し、分類学上は 18 属 84 種に及ぶ巨大な分類群を構成している。しかし、16S rRNA 配列に基づいた現在の酢酸菌の分類体系には混乱や曖昧さがあることが指摘されているため、演者らはゲノム情報を用いた系統解析を行い、酢酸菌群の再整理を試みている。[1, 2] 今回はその中で、*Acetobacter* 属のゲノム準拠の系統解析において、既存の分類体系とは異なる興味深い知見が得られたため、これについて検証を行ったので報告する。
【方法】*Acetobacter* 属 18 種のゲノム情報（ドラフトゲノム配列 17 種、コンプリートゲノム配列 1 種）を用いて解析を行った。ゲノム準拠の系統は、全株で共通して保持するオルソログ遺伝子を連結し ML 法で解析した。Total number of core genes (TNCG) 解析は、BlustClust の結果準拠で行った。Average Amino acid Identity (AAI) 解析は、ANI/AAI Matrix を用いて行った。両属の表現性状については 35 項目の試験を行った。
【結果および考察】ゲノム準拠（連結オルソログ遺伝子配列準拠）の系統解析結果、*Acetobacter* 属酢酸菌は *A. aceti* を含む 4 種と *A. pasteurianus* を含む 14 種の二グループに分かれ、両グループ間の進化距離は異属レベルに相当することが認められた一方、16S rRNA 準拠の系統および表現性状ではそのような特徴は見られなかった。両グループの独立性について、1) 二株間で共通して保持する遺伝子数（total number of core genes：TNCG）の総当たり解析、2) 二株間で共通して保持する全遺伝子配列のアミノ酸レベルでの相同性（AAI）の総当たり解析により検証を行ったところ、いずれの解析においても、ゲノム準拠の系統で示された二グループに対応する形で明確に二分される結果が得られた。二つのグループ間の数値の差は、両解析とも他の酢酸菌群では異属レベルの値となり、また、既に提唱されている AAI 値の属判定指標からも、両グループは異属に相当することが示された。以上のことより、*Acetobacter* 属の二グループは、ゲノム情報準拠で判定した場合異属に相当するものの、現行の分類基準では明確に同属と判定され、これは現在のバクテリア分類法の限界を示すとともに、今後の系統分類を考える上で重要な知見となると考えられた。
1) 貝沼（岡本）ら：日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集, 2C20a06 (2012)
2) 貝沼（岡本）ら：日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集, 2A08p09 (2014)

Acetobacter, genome information, phylogenetic analysis

発表責任者：貝沼(岡本)章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2A01a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A01 会場

Draft genome and description of Novimethylophilus kurashikiensis gen. nov. sp. nov., a new lanthanide-dependent methylotrophic species of Methylophilaceae

○HAOXIN LYU, AKIO TANI (Okayama Univ.)

Objective

Methane and methanol emissions from agriculture and plants are contributing the carbon cycle on the planet. On the surface of plants, there are many kinds of methylotrophs that can utilize these C1-compounds. Gram-negative bacterial methylotrophs utilize PQQ- and Ca^{2+}-dependent methanol dehydrogenase (MDH) encoded by *mxaFI*. Recently, lanthanide metal (Ln^{3+}) has been shown to be an essential cofactor for another MDH, XoxF-type MDH. *xoxF* exists in wider array of microbial genomes but has been poorly characterized. Since many bacterial genomes contain only *xoxF* but not *mxaF*, Ln^{3+} might be an essential cofactor to isolate novel microorganisms. We aimed to isolate Ln^{3+}-dependent methanotrophs/methylotrophs using methane as a sole carbon source from rice rhizosphere, and isolated a novel La^{3+}-dependent non-methanotrophic methylotroph, strain La2-4. Its 16S rRNA gene showed only 93.4% identity to that of *Methylophilus luteus* Mim^T, and we propose *Novimethylophilus kurashikiensis* gen. nov. sp. nov for strain La2-4. The methylotrophy of strain La2-4 based on genomic information was investigated in this study.

Methods and Results

The growth of strain La2-4^T on methanol with different concentration of La^{3+} (from 0 to 30 μM) showed that La2-4^T prefers relatively high La^{3+} concentration. The growth of strain La2-4^T on methanol with different kinds of Ln^{3+} showed that only lighter Ln^{3+} such as La^{3+}, Ce^{3+}, Nd^{3+}, and Pr^{3+} enable the growth of La2-4^T on methanol. The growth of strain La2-4^T on methylamine was independent of La^{3+}, however, the presence of La^{3+} enhanced its growth slightly.

The strain La2-4^T genome was sequenced with a MiSeq sequencer. Its draft genome (ca. 3.69 Mbp, G+C content 56.1%) encodes 3579 putative CDSs and 84 tRNAs. The genome harbors five *xoxF*s but no *mxaFI*. SDS-PAGE analysis, subsequent mass spectrometric analysis, and qPCR analysis revealed that XoxF4 is the major MDH in the cells grown on methanol and methylamine. Methylamine dehydrogenase gene was absent in the La2-4^T genome, while genes for the glutamate-mediated methylamine utilization pathway were found. The genome also harbors those for the tetrahydromethanopterin and ribulose monophosphate pathways.

XoxF, lanthanide, methylotroph

発表責任者：AKIO TANI（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A01a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A01 会場

Methylobacterium aquaticum strain 22A におけるメタノール脱水素酵素遺伝子のランタノイド依存的制御

Lanthanides-dependent regulation of methanol dehydrogenase genes in Methylobacterium aquaticum 22A

○平賀 翔大、藤谷 良子、谷 明生 (岡山大植物研)
○Shota HIRAGA, Yoshiko FUJITANI, Akio TANI (IPSR Okayama Univ.)

【目的】植物葉上に多く存在する Methylobacterium 属細菌は、植物から放出されるメタノールをメタノール脱水素酵素(MDH)によって酸化し炭素源やエネルギー源として生育に利用する。本属細菌はその活性化にカルシウムを要求する MxaF 型と希土類であるランタン等を要求する XoxF 型の 2 種の MDH を保持しており、XoxF 型酵素は酵素の活性化に希土類元素が必要とされる初めての例である。これら 2 種の酵素には補因子を結合する部位のアミノ酸残基に違いが見られ、この違いが金属イオン要求性を決定しているのではないかと考えられている。本研究室で分離された植物生育促進能を示す M. aquaticum 22A について MxaF の発現が XoxF 遺伝子の存在に依存していることが明らかとなっている。このように金属要求性の異なる二つの MDH 遺伝子の発現制御機構は希土類と XoxF の存在に依存しているが、その分子メカニズムは明らかになっていない。xoxF 欠損株からメタノールへの生育が回復した復帰変異株を複数取得し、ゲノムリシーケンスの結果、共通してセンサーヒスチジンキナーゼをコードする MxbD 遺伝子に変異が確認された。MxbD は、2 種の MDH の切り替えを担っているとされているが、そのリガンド等を含めて詳細な機能は不明である。そこで MxbD の役割を明らかにするとともに、MDH の金属配位アミノ酸残基による金属要求性の変化の同定を目的とした。

【方法および結果】RNA-Seq の結果より MxbD 遺伝子はランタン非存在下で高発現していたため、MxaF 遺伝子の発現に直接関与していると考えられた。MxbD 遺伝子欠損株を作成したところ、ランタン存在下でメタノールに生育し、非存在下では生育しなかった。このことから MxbD は MxaF の発現に必要であり、XoxF には必要でないことが確認された。欠損株に対して MxbD 遺伝子を導入したところ、ランタン非存在下でのメタノール生育が回復し相補が可能であると確認した。MxbD 欠損株に対して復帰変異株由来の変異型 MxbD 遺伝子を導入しても生育が回復するが、その生育と MxaF 遺伝子発現が XoxF に依存している可能性があるため、現在 XoxF, MxbD 両遺伝子欠損株の作製と変異型 MxbD 遺伝子の導入を行っている。また、野生株が保持する MDH ホモログを全て欠失させた株に対して、補因子結合部位のアミノ酸残基を変更した MDH 遺伝子を導入し、金属要求性の変化を同定することを検討している。

Methylobacterium, Methanol dehydrogenase, Lanthanide

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A01a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A01 会場

Methylobacterium 属細菌におけるメタノール走化性センサーの機能解析
Functional analysis of methanol-chemotaxis sensor in *Mehylbacterium* species
○春名 優希[1]、加藤 純一[2] ([1]岡山大植物研、[2]広島大院先端物質科学)
○Yuuki HARUNA[1], Junichi KATO[2] ([1]IPSR Okayama Univ., [2]Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.)

【目的】
植物は年間約 1 億トンものメタノールを大気中に放出しており、そのメタノールを利用できる *Methylobacterium* 属細菌は植物表面上の細菌の 10-20%を占めている優占種である。本属細菌は植物の生育を促進する働きがあり、植物にとって有益な共生細菌であると考えられている。その共生が成立する前の段階で、本属細菌は何らかの植物由来の物質を感知してその存在を探し当てていると考えられる。私たちはエゾスナゴケから分離した *M. aquaticum* 22A 株がメタノールに対して走化性を示すことを見いだした。細菌の走化性はセンサーである methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) から発せられるシグナルと複数の chemotaxis protein によって鞭毛の回転方向が制御されることにより起こり、MCP の数だけ多様な化合物を認識すると考えられている。22A 株のゲノム中には MCP と考えられる遺伝子が 52 個存在する。RNA-seq による発現解析データからメタノールセンサーMCP 候補遺伝子を選抜し、3 つの遺伝子(188d,460c,473d)の欠失株の走化性が失われたこと、また三重欠失株はアミノ酸等には野生株と同等の走化性を示したことにより、これらがメタノール走化性に関与することを明らかにした。本研究では、これら 3 つの MCP の分子機構の解明を目的とした。
【方法と結果】
3 つの MCP 遺伝子の構造として、188d は MCP signal ドメインのみから構成されており細胞質局在と考えられた。460c は Energy taxis を司るとされる PAS ドメインを保持していた。473d はペリプラズムドメインと HAMP ドメインを保持していた。GFP タグタンパク質の細胞内での局在解析を行ったところ、188d は細胞質、460c は細胞膜または極, 473d は極に局在した。これら 3 遺伝子の、単独遺伝子欠損株や二重遺伝子欠失株において走化性が完全に失わないことから、3 つの MCP がそれぞれ独立して機能していると考えられた。それぞれの遺伝子の相補株では、188d のみ走化性が回復した。その局在から 188d は他のタンパク質と相互作用していると考えられた。それぞれの遺伝子欠損株の走化性をランタン存在下で検討したところ、Δ460c において走化性の低下が確認されたことから、460c はランタン存在下での代謝に依存したメタノールへの走化性に関与していると考えられた。三重遺伝子欠失株はイネとシロイヌナズナの根に対して集まる活性が野生株より遅くなることから、植物から放出されるメタノール及びメタノールへの走化性が本属細菌において共生を成立させる重要な因子であると結論した。

Methylobacteriu, methanol, Methyl-accepting chemotaxis protein

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A01p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A01 会場

竹粉の田面施用が土壌の窒素固定活性に及ぼす影響

Effect of field application of bamboo powder on soil nitrogen fixation activity.

○嵐田 遥、平井 英明、前田 勇 (宇大農)
○Haruka ARASHIDA, Hideaki HIRAI, Isamu MAEDA (Sch.Agric.Sci.,Utsunomiya.Univ.)

自然界で持続的に窒素固定反応を行うには、炭素源の持続的な供給、遊離アンモニア、酸素暴露からの防護が必要である。これら必要条件を達成した上で、自然界で実際に窒素固定を行っている細菌の例として、根粒菌などの共生型窒素固定細菌が挙げられる。しかしこれらは宿主選択性が高く、生来の宿主以外への植物栽培への適用は困難である。一方非共生窒素固定細菌は、窒素固定の際に特定宿主との関係性に依存しないため、微生物資材として人為的に利用する際に汎用性が高い。このような利点を持つ非共生型窒素固定細菌を有効に利用し、生物学的窒素固定の農業利用を高めるために、まず初めに高 C/N 資材である竹粉施用による耕作地土壌への炭素源の人為的供給を検討した。実験では、竹粉施用土壌、化学肥料施用土壌中の窒素固定活性の測定、また各土壌からの窒素固定細菌の単離を行った。初めに、大学附属農場圃場にて化学肥料(JA はが野専用 A925 号 10-18-16　30kg/10a　2017 年 5 月、7 月施用)施用区、竹粉(栃木・茂木町産美土里竹粉　50kg/10a　C/N:300　農場牛糞堆肥 1t/10a　C/N:10) 施用区を設定し、収穫後の秋耕前に土壌試料の採取を行った。なお、圃場土壌は黒ぼく土を使用した。土壌の窒素固定活性の測定では、竹粉施用土壌、化学肥料施用土壌のそれぞれで、グルコース 1%溶液添加、滅菌水添加、無添加のサンプルのニトロゲナーゼ活性を、アセチレン還元法により GC-FID で測定した。結果、どちらの土壌もグルコースを添加したサンプルで比較的高いニトロゲナーゼ活性が見られ、ここから、土壌でのグルコースを資化する窒素固定細菌の存在が考えられた。また、化学肥料施用土壌に比べて竹粉施用土壌で高いニトロゲナーゼ活性が見られたが、これは竹粉により土壌中の C/N 比が上昇し、土壌中が窒素欠乏条件となり、ニトロゲナーゼが活性化したことによると考えられる。さらに、好気性単性窒素固定細菌用寒天培地上に竹粉土壌、化学肥料土壌をそれぞれ滅菌水にて希釈した希釈液を塗抹し、5 日間培養し、コロニーを計数した。その結果、化学肥料施用土壌希釈液に比べ、竹粉施用土壌希釈液にてコロニー数が多い結果となった。ここから、竹粉の添加により圃場土壌で窒素固定細菌数が増加することが明らかとなった。今後はこれら土壌細菌叢の 16SrRNA 遺伝子配列のシーケンス解析を行い、窒素固定細菌の検出をすることで、土壌への竹粉添加と、それに伴う窒素固定活性の増加の関係性を明らかにする予定である。

nitrogenase, diazotroph, bamboo powder

講演番号：2A01p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A01 会場

土壌環境の違いによる総細菌数、炭化水素分解菌、窒素固定菌、および Bacillus 属細菌の解析
Quantitative analysis of hydrocarbon degrading bacteria nitrogen fixing bacteria, Bacillus bacteria in various soils
○柴田 徹、嶋岡 邦彦、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命科）
○Toru SHIBATA, Kunihiko SHIMAOKA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumei Univ.)

【背景・目的】
地球上では、環境中の様々な物質が生物に利用されることで循環している。その中でも、窒素循環と炭素循環は生物にとって重要な物質の循環である。窒素循環においては、窒素固定菌が大気中の N_2 ガスから NH_3 を合成し、*Bacillus* 属細菌を含む細菌が有機態窒素の分解や脱窒を行い、これらの細菌が窒素循環を促進させる役割を担っている。炭化水素分解菌は、植物のワックスなど炭素化合物の分解に関与し、土壌中に遍在的に存在するため炭素循環に重要な役割を担っている。このように土壌微生物には様々な機能を持っているものが存在するが、これらが様々な土壌にどのような割合で存在するか十分な知見がない。本研究では、炭化水素分解菌、窒素固定菌、*Bacillus* 属細菌に着目し、土壌中の細菌におけるこれらの割合、土壌環境と細菌の関係について解析することを目的とした。
【方法・結果】
はじめに様々な環境の土壌 1 g から slow-stirring 法を用いて DNA を抽出し、土壌の総細菌数を算出した。その結果、自然環境中の土壌には 6.94×10^7～33.57×10^8 個の細菌が存在していることが確認された。次に抽出した DNA を用いて real-time 定量 PCR を行った。炭化水素をアルコールに変換する酵素をコードするアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子である *alkB* 、ニトロゲナーゼ還元酵素の遺伝子である *nifH*、芽胞形成遺伝子である *spo*0A をそれぞれ標的遺伝子としたプライマーを設計し、炭化水素分解菌、窒素固定菌、*Bacillus* 属細菌の定量を行った。そして、土壌環境と細菌の関係解析を行った結果、土壌の総細菌数に比べ、3 種の菌は土壌環境によらず、一定の割合で土壌中に存在していることが分かった。また、炭化水素分解菌、*Bacillus* 属細菌は窒素固定菌に比べて多くの割合で土壌中に存在することがわかった。

Bacillus, alkB, nifH

講演番号：2A01p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A01 会場

新規細菌の分離源としてのササラダニ類の解析
Investigation of oribatid mites (Acari: Oribatida) as a source for isolation of novel bacteria.
○飯田 敏也、工藤 卓二、大熊 盛也（理研 BRC-JCM）
○Toshiya IIDA, Takuji KUDO, Moriya OHKUMA (RIKEN BRC-JCM)

土壌表層に生息する多様な小型土壌動物は、土壌における細菌の大きな多様性に寄与していると考えられる。しかし、小型土壌動物と細菌の関連性については知見が乏しいことから、本研究では土壌表層に生息するササラダニ類に着目し、それら土壌動物を分離源とした新規細菌の分離培養を試みると共に、ササラダニ類に由来する細菌の群集解析を行った。

理化学研究所筑波事業所の構内において、落葉が薄く堆積する土壌の表層部（落葉を含む）を採取し、ツルグレン装置にて土壌動物を抽出した。構内土壌サンプルから継続的に高頻度で抽出され、ササラダニの一種と考えられた 5 種のダニを標的とし、各々のササラダニ種個体を実体顕微鏡観察下で 2-10 頭採取した。滅菌水中での 5 分間の攪拌によりダニ体表の付着物を除いた後、1 mm 径ジルコニアビーズにて穏やかに粉砕した。粉砕液上清を適宜希釈し、R2A 寒天培地に塗布後、25 度好気環境下で培養した。同時に、ダニ粉砕液を 0.2 mm 径ジルコニアビーズにて更に破砕処理し、その上清を鋳型として真核生物の 18S rRNA 遺伝子または細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーによる PCR を行った。18S rRNA 遺伝子増副産物の塩基配列から、5 種のダニがいずれもササラダニ亜目（Acari: Oribatida）に分類されるものであり、それぞれアミメオニダニ科、モンツキダニ科、ヘソイレコダニ科及びフリソデダニ科に分類されるものであることが確認された。ササラダニ粉砕液を分離源とした分離培養の結果、ササラダニ種により出現細菌コロニー数に差が見られた。アミメオニダニ科の検体からは比較的多くの細菌が分離された一方、フリソデダニ科検体のコロニー出現頻度は低く、動物個体あたりの細菌コロニー数で 10 倍以上の開きが見られた。5 種のササラダニ種検体から分離されたコロニーから計 206 コロニーを選択し、27F プライマーによる細菌の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（およそ 800 bp）を解析した。その結果、既知基準株配列との比較における相同性が 96%未満であったものが 21 株分離されたが、それらの多くがモンツキダニ科の検体に由来していた。現在、5 種のササラダニ粉砕液を鋳型とした 16S rRNA 遺伝子増副産物について、アンプリコンシーケンス解析を実施している。

Oribatid mites, Bacterial community structure

発表責任者：飯田敏也（tiida@riken.jp）

講演番号：2A01p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A01 会場

細胞性粘菌と土壌線虫における生物間コミュニケーションの解析
Chemical communication between the cellular slime molds and nematodes.
○齊藤 佑美子[1]、宮崎 早紀[1]、白神 美菜子[1]、永松 ゆきこ[2]、Bartlem Derek[3]、齊藤 玉緒[4]([1]上智大院・理工、[2]パネフリ工業株式会社、[3]北海道大・農、[4]上智大学・理工)
○Yumiko Saito[1], Saki Miyazaki[1], Minako Shiraga[1], Yukiko Nagamatsu[2], Derek Bartlem[3], Tamao Saito[4] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Panefri industrial co., Ltd, [3]Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [4]Faculity of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】土壌微生物である細胞性粘菌と線虫は、生息域が同じで餌を共有するなど、相互に密接に関係している。本研究では、農作物に寄生し、全世界での被害額が年間$1570 億にも上っている植物寄生性線虫の中でも特に甚大な被害を与えている *Meloidogyne*（ネコブセンチュウ）に着目した。そして、細胞性粘菌とどのような相互関係があるのかを解析するため、細胞性粘菌が *Meloidogyne* に与える影響の定量的解析法の確立とそれを用いた生物間コミュニケーションの解析を目指した。

【方法】飢餓処理した細胞性粘菌をプレートの端にのせた濾紙上で発生させ、子実体形成後にそれを取り除き、濾紙から 1.2 cm 離れた場所に *Meloidogyne* を播種した。24 時間後に *Meloidogyne* の歩いた跡を画像解析ソフトで定量化し、誘引側とその忌避側のどちらに多く線虫が移動したか比較した結果、濾紙を通過した細胞性粘菌由来の物質が *Meloidogyne* の忌避行動を引き起こすことが判明した。そこで、細胞性粘菌抽出物を作製し、それを浸み込ませて風乾した濾紙を使用した場合の *Meloidogyne* の挙動を解析した。
また、*Meloidogyne* と同じ土壌線虫ではあるが生活環の異なる自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* に関しても細胞性粘菌抽出物の影響を解析し、*Meloidogyne* と比較検討した。

【結果・考察】*Meloidogyne* は忌避側に多く動いており、細胞性粘菌抽出物には *Meloidogyne* の忌避行動を引き起こす物質が含まれていることが示された。逆に *C. elegans* に関しては抽出物に誘引される結果となった。これは、細胞性粘菌にとって土壌線虫が胞子拡散の担い手であることが関係していると考えられる。
今後は、*Meloidogyne* に影響を与えている化学物質の同定を行うと共に、線虫の忌避行動や細胞性粘菌が忌避物質を産生する機構を解析する予定である。

Dictyostelium, *Meloidogyne*, chemical communication

講演番号：2A01p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A01 会場

メタ 16S 解析による渡良瀬遊水地の環境細菌
16S amplicon analysis of environmental bacteria in Watarase retarding basin
○荒川 理彩[1]、田口 尚幸[1]、木川田 喜一[1]、木村 信忠[2]、斎藤 玉緒[1] ([1]上智大・理工、[2]産総研)
○RISA ARAKAWA[1], NAOYUKI TAGUCHI[1], YOSIKAZU KIKAWADA[1], NOBUTADA KIMURA[2], TAMAO SAITO[1] ([1]Sophia Univ., [2]AIST)

【背景・目的】高度経済成長期、日本では当時全国一の銅生産量を占めていた足尾銅山による鉱害が深刻な問題となっていた。こうした背景から鉱毒防止対策などを目的としてつくられたのが渡良瀬遊水地である。現在、動植物や重金属など渡良瀬遊水地に対する様々な診断・調査が行われている中、 我々はメタ 16S 解析による土壌、水質サンプル中の微生物解析を行い地質・水質の性質や状態を診断し今後の環境保全対策を行う際の一つの評価基準になることを目的とした。

【方法】2017 年 6 月渡良瀬遊水地周辺のサンプリングを行った。土壌は 5 か所(各々表層、地下 30 ㎝)計 10 サンプル、水は 6 ヵ所で 6 サンプルを採取した。サンプルは土壌、水ともに pH と温度をそれぞれ測定し、採取した全サンプルについて 16S Amplicon 解析を行った。次世代シーケンサーにより決定した塩基配列の解析は微生物群集解析専用ソフト QIIME を用いて行い、地点による細菌叢の違いを比較した。また土壌に関しては、各サンプルの重金属(Zn、Cu、Fe、As)の抽出量の解析も合わせて行った。

【結果】重金属の解析データによると、以前鉱害被害を受けたとされる谷中村の旧役場跡地の地下 30 ㎝の土壌からは比較的多くの重金属が検出されたが、ヨシ原浄化施設付近の土壌はほかの地点と比べて Fe 以外の3項目の重金属の値が最も少なかった。QIIME により解析した細菌叢構造から、全ての地点においてOTU 数は表層と比べ地下 30 ㎝の方が低かった。特に、重金属が他の地点より多かった旧役場跡地の地下 30 ㎝においては最も少ないことが示された。このことから微生物の多様性は重金属による影響を受けていることが示唆された。 また水中の細菌叢構造ではヨシ原浄化施設付近とその他の地域との間で明らかな違いが見られた。主に Cyanobacteria 門に関して、ヨシ原浄化施設付近の 2 地点は 5～6%の存在量であったのに対し、施設から離れたその他の地域 4 地点については 10～20%と高い値であった。 このことからヨシ原浄化施設による環境浄化の効果は確認できると考えられる。さらに細菌叢構造は環境変化に影響を受けている可能性があることが推察できた。

16S amplicon analysis

講演番号：2A01p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A01 会場

循環型汚水浄化槽内のアミノ酸代謝系の解析とその関連細菌の推定

Analyses of amino acid metabolism system and estimation of the related bacteria in the lab-scale wastewater treatment system

○日下 みのり、増子 幸佑、有見 芳樹、鈴木 智順（東理大 応生）
○Minori KUSAKA, Kosuke MASUKO, Yoshiki ARIMI, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Depatment of Applied Biological Science)

【目的】 水質浄化において窒素やリンの挙動、難分解性物質など特定の物質の分解機構は盛んに研究されているが、普遍的な微生物活動である易分解性有機物の分解に関わる細菌の種類や分解機構は十分に解明されていない。本研究では、普遍的な有機物分解反応の解明を目的として、複合微生物系におけるタンパク質の代謝に着目した。具体的には、易分解性有機物の分解に関わる細菌とタンパク質の分解過程で生じるアミノ酸などを解析することを目的としている。
【方法】 有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングが可能なラボスケールの循環型汚水浄化装置を構築した。これはスポンジを担体とした好気槽、嫌気槽からなり、好気・嫌気的な逐次的反応系を持つ装置である。この装置に生活排水を模した人工汚水を循環させ、装置内の担体に定着させた微生物群により有機物の分解を行っている。人工汚水を投入した時点から経過時間毎に細菌叢と水質の変化を追った。細菌群集構造解析のため、16S rDNA-PCR-DGGE 法を行った。また、タンパク質分解に伴う汚水中のアミノ酸量を解析するため、HPLC で分析を行った。さらに、タンパク質分解によって生じるアミノ酸の代謝過程を解析するため、各種酵素活性（aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase）の測定、水質項目として TOC、pH、タンパク質量、アンモニア態窒素量をそれぞれ測定した。
【結果】 一度目のモニタリング実験の結果、各種酵素活性で経過時間毎に異なったピークを確認した。同時に測定した TOC は人工汚水投入直後にピークがみられた後に減少傾向を示した。これらの結果から、有機物の分解過程は合成と代謝による顕著なアミノ酸の増減が繰り返されて進行すると考えられる。また、TOC の変化が小さくなった測定経過時間後半にも各種酵素活性には変動が見られたことから、総有機物量に変化がなくてもタンパク質の分解が継続して行われているのではないかと予想される。さらに、同時に測定したアンモニア態窒素量でも複数のピークがみられたが、各種酵素活性のものとは時間差があることが確認された。これらの結果から、各種酵素の働きによりアミノ酸が分解され、汚水中にアンモニア態窒素として検出されるのではないかと考えられる。二度目のモニタリング実験では、アンモニア態窒素ではなく汚水中の各アミノ酸を HPLC でそれぞれ定量し、各種酵素活性や細菌叢との関連性を確認した。現在、アミノ酸量について測定経過時間ごとに定量しており、各種酵素活性のピークとの関連性も確認されると予想される。さらに、各種酵素活性に深く関わっている細菌については PCR-DGGE 法を用いて解析し、併せて報告する予定である。

wastewater, DGGE, amino acid

講演番号：2A01p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A01 会場

16S rDNA-RT-PCR-DGGE 解析を利用したモデル浄化槽における主要なタンパク質分解細菌の推定
Estimation of major protein-degrading bacteria on model wastewater treatment system by 16S rDNA-RT-PCR-DGGE analysis

○増子 幸佑、島田 紘帆、榊原 健太、鈴木 智順（東理大 応生）
○KOSUKE MASUKO, HIROHO SHIMADA, KENTA SAKAKIBARA, TOMONORI SUZUKI (Tokyo university of science, Department of Applied Biological Science)

【目的】 タンパク質は生活排水中の成分の1つであり、さまざまな微生物の栄養源となりうる。そのため、環境中への過剰なタンパク質の流出を阻止する必要がある。しかし、汚水処理における微生物の同化・異化メカニズムについては不明な点が多いのが現状である。本研究では、循環型汚水浄化槽内での微生物による汚水中のタンパク質分解に関する代謝系について解明するため、タンパク質分解過程において、プロテアーゼ活性に関わりのある細菌の推定を試みた。

【方法】 循環型汚水浄化槽は好気槽と嫌気槽からなり、互いに汚水が常時循環している装置で、週に一度、生活排水を模した人工汚水と浄化槽の汚水とを交換し、運転している。プロテアーゼ活性に関わりのある細菌を推定する際、タンパク質分解の活性を上げるため、5 倍濃度の人工汚水を投入し、継時的にサンプリングを行った。細菌叢を網羅的に解析するために、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌に対してそれぞれに適した RNA 抽出方法とプライマーを用いて解析した。RNA を用いた理由は、プロテアーゼ生産が盛んな細菌ではタンパク質合成の場であるリボソームの存在量が多くなり、そのリボソームの骨格である rRNA の量も多くなると考えたからである。そこで、16S rDNA-RT-PCR-DGGE 法を用いて、各サンプリング時のバンドの太さを rRNA 量とみなし、バンドの太さと細胞内外のプロテアーゼ活性の挙動との比較を行った。プロテアーゼ活性測定には、5 種類の MCA 基質(Leu-MCA, Phe-MCA, B-LGA-MCA, B-GAA-MCA, S-LLVY-MCA)を使用した。そして、上記 DGGE バンドパターンとプロテアーゼ活性の挙動に高い相関があるバンドの絞り込みを行った。さらに、そのバンドの泳動位置と一致する浄化槽分離株の DGGE バンドの検索を行い、一致したバンドの分離株をプロテアーゼ活性に関わりのある細菌とみなし、現在解析を進めている。

【結果】 今回の実験では、グラム陰性細菌の 16S rDNA-RT-PCR-DGGE 法と細胞内外のプロテアーゼ活性の結果から、2つの細胞内プロテアーゼと高い相関($r>0.7$)があるバンドが複数検出された。プロテアーゼ活性を示した基質は2つで、アミノペプチダーゼ型のプロテアーゼ活性を示す Phe-MCA と、キモトリプシン型のプロテアーゼ活性を示す S-LLVY-MCA であった。プロテアーゼ活性に関わりのある細菌の推定については、現在解析中で、16S rDNA-RT-PCR-DGGE 法で得られたプロテアーゼ活性と高い相関をもつバンドと一致したバンドの分離株が得られた場合は分離株のシークエンス解析結果を、分離株が得られなかった場合はバンドのシークエンス解析結果をグラム陽性細菌の結果とともに報告する予定である。

wastewater treatment, microbial flora, protease

講演番号：2A01p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A01 会場

米乳酸発酵食品における *Lactobacillus sakei* の生育特性の詳細解析
Growth property of *Lactobacillus sakei* in rice-based lactic acid-fermented foods
○鶴貝 采映[1]、辻 篤史[2]、小柳 喬[1] ([1]石川県大、[2]石川県工試)
○Kotoe TSURUGAI[1], Atsushi TSUJI[2], Takashi KOYANAGI[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Indust. Res. Inst. Ishikawa)

《背景・目的》日本では古来から米を用いた乳酸発酵食品が食されており、石川県にも数多くの米乳酸発酵食品が存在する。これらの石川県産食品のなかでも、山廃酒母、かぶら寿司においては *Lactobacillus sakei* が優勢化し、保存性を高めていることをこれまでに明らかにしている。乳酸菌の優勢化には温度、糖度、その他の成分状態などの様々な要因が関わっていると考えられるが、現在その優勢化のメカニズムについては深く理解されていない部分も多い。本研究では、山廃酒母、かぶら寿司をモデルとした米麹甘酒を培地として用い、温度と Brix 値が *L. sakei* の生育にどのような影響を与えるかについて詳細に調べた。さらに、米乳酸発酵食品の汚染源となる細菌に対する *L. sakei* の生育優位性についても調査した。
《方法》米麹、炊飯米、水を 1：1：2 の割合で混合し 55℃で糖化させ培地となる米麹甘酒を作製した。山廃酒母由来 *L. sakei* YP14-8 株を米麹甘酒に単菌接種（生菌数密度 10^4 cfu/ml）し、培養温度 2 点（10, 25℃）、甘酒の Brix 値 6 点（5, 10, 15, 23, 30, 35%）の組み合わせで条件を変化させ、生菌数および pH を測定し生育特性を調査した。また、同様の条件で、山廃酒母やかぶら寿しの汚染の原因となり得る腐敗細菌 3 種（*Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis, Escherichia coli*）を単菌で、もしくは *L. sakei* と共に接種し、*L. sakei* との生育特性の違いと競合性を観察した。山廃酒母における細菌叢変遷の解析については、16S リボソーム RNA 遺伝子中の V4 可変領域を使用し、Illumina MiSeq を用いた細菌叢解析を行った。
《結果》山廃酒母中の細菌叢変遷において、仕込年度ごとに発酵初期の出現菌種に差異はあるものの、最終的に *L. sakei* が優勢化する同様の傾向がみられた。このことから、米乳酸発酵食品中において本菌種による優勢化が恒常的に起こることがあらためて確認された。米麹甘酒中において *L. sakei* の生育特性を調査したところ、増殖速度に差が見られたもののいずれの培養条件においても *L. sakei* の十分な生育が見られ(約 10^8 cfu/ml)、汚染細菌と競合した場合も優勢化が見られた。以上のことから、温度や Brix という条件は必ずしも *L. sakei* の優勢化の一因ではないと考えられ、米麹や米麹糖化物の成分が *L. sakei* の優勢化を後押ししている可能性が示唆された。しかし、*L. sakei* と *B. subtilis* を競合させた際に、高 Brix（23, 30, 35%）において死滅していた *B. subtilis* が低 Brix（5, 10, 15%）においては残存していたことから、汚染細菌を抑止するという点において高 Brix が重要であることが明らかとなり、これはかぶら寿司や山廃酒母の製造条件と一致していた。

fermented food, lactic acid bacteria, microbiota

発表責任者：小柳　喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A01p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A01 会場

フルクトフィリック乳酸菌 *Leuconostoc citreum* F192-5 株の菌株特異的な環境適応に関する研究
Genomic and biochemical characterization of fructophilic lactic acid bacterium *Leuconostoc citreum* F192-5, to study adaptation to its fructose-rich habitat

○前野 慎太朗[1]、梶川 揚申[2]、谷澤 靖洋[3]、兼崎 友[4]、久保田 恵理[4]、中川 純一[5]、有田 正規[3,6]、ディックス レオン[7]、遠藤 明仁[5] ([1]東農大生物産業学研究科、[2]東農大応用生物科学、[3]遺伝研生命情報センター、[4]東農大生物資源ゲノム解析センター、[5]東農大食品香粧学科、[6]理研環境資源科学研究センター、[7]ステレンボッシュ大学微生物学科)
○SHINTARO MAENO[1], AKINOBU KAJIKAWA[2], YASUHIRO TANIZAWA[3], YU KANESAKI[4], ERI KUBOTA[4], JYUNICHI NAKAGAWA[5], MASANORI ARITA[3,6], LEON DICKS[7], AKIHITO ENDO[5] ([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, [3]Center for Information Biology, National Institute of Genetics, [4]Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, [5]Department of Food and Cosmetic Science, Tokyo University of Agriculture, [6]RIKEN center for Sustainable Resource Science, [7]Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Stellenbosch)

【背景】
Leuconostoc citreum は植物質環境に生息している一般的な乳酸菌であり、グルコースを生育基質として最も好む。しかし、我々が温州ミカンより分離した *L. citreum* F192-5 株はグルコースを生育基質とした培養ではほとんど生育しないが、フルクトースを糖源とするか、グルコースを糖源としてもピルビン酸を電子受容体として添加すると良好な生育を見せるという典型的なフルクトフィリックな特徴を有しており、このような報告はこれまでにない。そこで、本研究ではゲノム解析と分子生物学的な手法を用いて、F192-5 株が遂げた環境適応に迫ることを目的とした。
【結果と考察】
まず、F192-5 株と 9 菌株の *L. citreum* のゲノムデータの比較解析を行った。F192-5 株と他の *L. citreum* 菌株ではゲノムサイズ、遺伝子数の両方に大きな差は見られなかった。その一方で、フルクトフィリック乳酸菌の代表菌群である *Fructobacillus* 属よりもゲノムサイズが非常に大きく、遺伝子数も多かった。さらに、*Fructobacillus* 属は糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させているが、F192-5 株にはこのような特徴は見られなかった。これらの特徴は *Fructobacillus* 属とは、大きく異なるゲノムレベルでの進化をしてきたことを示めしている。また、それぞれの *L. citreum* の特異的遺伝子を抽出したところ、68 個の F192-5 株特異的遺伝子のうち 11.7% が *Fructobacillus* 属からも見出された。これは、F192-5 株が *Fructobacillus* 属と近似した環境に生息してきたであると考えられる。*Fructobacillus* 属のフルクトフィリックな特徴は *adhE* 遺伝子の欠損によるものであるが、F192-5 株は *adhE* 遺伝子を有していた。そこで、発現解析を行ったところ、発現しておらず、*adhE* 遺伝子の上流にはプロモーター領域が見出されなかった。そのため、*adhE* 遺伝子が不活化していることが考えられた。そこで、*L. mesenteroides* 由来の *adhE* 遺伝子を導入したところ、グルコースを生育基質として良好な生育を見せ、一般的な乳酸菌と同様の生育特性を見せるようになった。このことから、F192-5 株は *adhE* 遺伝子の不活化によりフルクトフィリックな特徴を獲得したことが明らかとなった。
本研究の結果から、自然界には菌株レベルでフルクトフィリックな特徴を有する乳酸菌が存在している可能性が示唆された。これは菌種内で多様性をもつという乳酸菌の生残戦略の一つによるものであると考えられる。

leuconostoc citreum, fructophilic characteristics, comparative genomics

発表責任者：遠藤　明仁（a3endou@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：2A01p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A01 会場

Zymomonas mobilis の高温における細胞伸長の改善

Preparation and characterization of mutant of *Z. mobilis* .

○遠藤 慧[1]、山賀 啓[2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・応用生物、[3]東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター)

○Kei ENDO[1], Kei YAMAGA[2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Department of Applied Biosciences, Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ.)

【背景・目的】

エタノール生産菌である、*Zymomonas mobilis* は糖の資化速度が速く、高いエタノール生産性を示す。さらに培養の際、酸素が必要ないことや比較的にゲノムが小さい（約 2 Mb）などの利点を有する一方、発酵熱と代謝生産物であるエタノールにより菌の生育を阻害される。過去の研究より、培養温度を上昇していくと菌の分裂が阻害され細長い糸状の形態をとることで知られている。しかしながら *Z. mobilis* の糸状細胞における細胞膜と染色体 DNA の状態は報告されていない。本研究は生育至適温度よりも高温下における細胞伸長を抑えることを目的とした。また、現在糸状細胞の細胞膜と染色体 DNA の観察を検討している。我々は研究報告が少ない *Z. mobilis* subsp. *Pomaceae* NBRC13757 を対象に 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG)を用いた突然変異を誘発させた。

【結果】

我々は *Z. mobilis* NBRC13757 (野生株)に NTG を用いて変異株 ZEM1390 を獲得した。ZEM1390 株は 30℃の形態観察にて野生株よりも菌体が小さいことが明らかになった。さらに温度上昇(37、40℃)に伴う細胞の伸長が抑えられており、ZEM1390 株は高温下における細胞伸長の改善が確認された。また、走査型電子顕微鏡 (SEM)による観察では、変異株にて 30℃と 37℃にて細胞表面の形状に変化が認められた。培養温度が野生株および変異株それぞれに及ぼす影響の違いを解析するため、細胞膜と染色体 DNA を多重染色し共焦点顕微鏡を用いた観察を行った。

【考察】

Z. mobilis NBRC13757 は高温下における熱ストレスによって細胞伸長は生じる。今回、我々は高温環境における細胞伸長の改善株、ZEM1390 株を獲得した。顕微鏡観察の結果、伸長が改善された ZEM1390 株は熱ストレスの感受性が低下したことが示唆された。また、前述したことから ZEM1390 株は野生株と比較して耐熱化が図られていると考えられる。我々は ZEM1390 株の変異箇所の解析を行うと共に、電子顕微鏡の結果から細胞膜に着目し、膜画分を回収しプロテオーム解析を行う予定である。

Zymomonas mobilis, Thermal adaptation, Morphology

講演番号：2A01p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A01 会場

寒冷環境から分離された酵母の凍結耐性における小進化の可能性

Possibility of microevolution of freeze tolerant yeast isolated from cold environments.

○森本 一輝、小西 正朗（北見工大）
○Kazuki Morimoto, Masaaki Konshi (Kitami Inst. of Technology)

冷帯および亜寒帯は、冬季に氷点下、夏季は高温と酵母にとっては過酷な環境である。環境中の酵母は冬季の凍結ストレスに適応するための戦略を持っている可能性があるにも関わらず、冷帯・亜寒帯の環境酵母の凍結耐性について十分研究されていない。本研究では冷帯気候に属する北海道北見市周辺の環境サンプルから分離した酵母の系統と凍結耐性との関係を調べた。

抗生物質入り YM 培地を用いて酵母を分離し、凍結融解操作後の生存率が高い 43 株を選別した。選別した酵母株について、凍結融解操作(凍結: -30°C, 24 h, 融解 30°C、10 min)後の生菌数を YM agar 培地で生菌数を計測し、死滅曲線を作成し半致死凍結回数 LF_{50}(Lethal Freezing time)算出した。凍結耐性が高いとされる酵母(*Saccharomyces cerevisiae* NBRC103964: LF_{50} =1.07 回) より LF_{50} が高い酵母 29 株を選別し、18S rRNA の DNA 配列に基づく系統解析を行った。

LF_{50} が 1.07 回以上の凍結耐性株が 29 株確認された。上位の SRF61、KRF61、SRT88 株の LF_{50} はそれぞれ 16.5, 7.73, 6.03 回であった。系統解析から、これらの株はそれぞれ *Candida tropicalis*、*Metschnikowia kunwiensis*、*Zygosaccharomyces rouxii* と同定された。形態学的・生化学的性質からもこれらの同定結果は支持された。その他の凍結耐性株は *Starmerella bombicola* 15 株、*Candida floricola* 8 株、*Candida kunwiensis* 2 株、*Candida* sp. YM2451, *Candida tropicalis*, *Metschnikowia reukaufii*, *Zygosaccharomyces rouxii* はそれぞれ 1 株確認された。最も耐性が高かった SRF61 株と同種の *C. tropicalis* NBRC 0199、NBRC 1404、NBRC 10241、NBRC 1403 の LF_{50} はそれぞれ 13.7, 2.40, 1.38, 1.03 回であった。NBRC 0199 株は SRF61 株と同様に高い凍結耐性を示したが、他の 3 株は一般的な酵母より凍結耐性が高いものの SRF61 株の 1/8～1/10 程度であることがわかった。また、*Z. rouxii* NBRC 1733, NBRC 1814, NBRC 0740, NBRC 0487, NBRC 0686 の LF_{50} はそれぞれ 3.77, 3.61, 2.64, 1.57, 1.28 回であった。いずれの酵母種においても、分離株が NBRC 保存株や基準株より、高い凍結耐性を示すことがわかった。この結果より、同種の酵母内でも株間で凍結耐性能に大きな違いが存在することが明らかとなった。寒冷環境中の酵母は冬季の凍結に適応する何らかの戦略を株レベルの進化(小進化)で獲得している可能性がある。

yeast, freeze tolerant

発表責任者：小西正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2A01p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A01 会場

椿山から分離した野生酵母の醸造適性分析

Evaluation of aptitude for brewing sake of the wild yeast isolated from TSUBAKIYAMA

○関 淑楓、工藤 泰良、山本 歩（八戸高専）
○Yoshika SEKI, Taira KUDO, Ayumi YAMAMOTO (NIT, Hachinohe College)

【背景および目的】

清酒市場は現在、近年の焼酎・ワインブームやアルコール消費量の低下の影響などを大きく受けており、特に地方の醸造企業に大きな打撃を与えている。その一方で、純米酒や純米吟醸酒は安定した出荷量を維持しており、今後、品質の高度化や安定化、差別化により更なる市場・消費の拡大が期待されている。このような背景のもと、近年、清酒業界では自然界より独自に単離した天然酵母による清酒醸造が活発化している。本研究では、青森県東津軽郡平内町にあるツバキの北限の自生地として国指定特別天然記念物に指定されている椿山のツバキから酵母の分離を試み、清酒醸造への適正を調べた。

【方法】

酵母の分離源として、椿山に自生するツバキの花、葉、枝および椿山の土壌を採取した。清酒醸造に適した酵母の分離には改良麹汁培地（Brix 10°、5%エタノール、アンピシリン、ストレプトマイシン含有、乳酸により pH3.5～4.0 に調整）を用いた。改良麹汁培地で得られた各酵母の rDNA（ITS1 領域）解析により種を同定した。種同定により *Saccharomyces cerevisiae* と確認された酵母についてはアルコール発酵力、キラー活性、低温耐性を分析し、清酒醸造への適正を確認した。

【結果】

本研究で分離源として用いた全ての試料において微生物の増殖が確認され、顕微鏡観察の結果いずれも出芽酵母の形態を示した。寒天希釈平板法により得られた出芽酵母の ITS1 領域を解析した結果、ツバキの枝のみから *S. cerevisiae* が分離された（以下、本酵母を椿山酵母）。得られた椿山酵母のコロニーから 50 個をランダムに選抜し（B1～B50 株とした）、協会 7 号酵母（以下、K7）に対するキラー活性を確認したところ、全ての椿山酵母で阻止円の形成は認められなかった。また、麹汁培地を用いたアルコール発酵力を調べた結果、K7 と同様のアルコール生成と糖度の減少を示す椿山酵母が確認された。以上の結果を踏まえ、ランダムに選択した 50 株の椿山酵母から以下の 10 株（B1、B2、B3、B6、B7、B8、B13、B22、B31、B35）に選抜した。清酒醸造は冬季に行われるため、実際の醸造温度に近い低温環境下（8℃）での酵母の生育を確認したところ、低温環境下でも K7 と同様の生育が確認できた。

以上より、選抜した 10 株の椿山酵母は清酒醸造に利用できる可能性があることが示唆された。

natural yeast, brewing, Saccharomyces Cerevisiae

発表責任者：山本　歩（yamamoto-c@hachinohe-ct.ac.jp）

講演番号：2A01p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A01 会場

異質 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* は異質 1 倍体配偶子を作ることができるのか？
Can interspecies hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* produce an allohaploid gamete?

○渡部 潤[1]、茂木 亮介[1]、上原 健二[2]、月岡 祐一郎[1] ([1]ヤマサ醤油、[2]秋田総食研セ)
○Jun WATANABE[1], Ryosuke Mogi[1], Kenji Uehara[2], Yuichiro Tsukioka[1] ([1]Yamasa Corp., [2]ARIF)

【目的】醤油の主発酵酵母である *Zygosaccharomyces rouxii* は近縁の 2 種間の交雑により生じた異質 2 倍体である。異質 2 倍体は同祖染色体の非相同性により正常な減数分裂ができないため不稔となるが、異質 2 倍体 *Z. rouxii* は染色体転座による Mating-Type 遺伝子座のヘテロ接合性の消失により，接合能を回復している。そのため、異質 2 倍体間での接合が可能であり、異質 4 倍体となることで染色体数を倍加させ、稔性を回復することに成功している[1)]。近年、野生の出芽酵母 *Saccharomyces paradoxus* における homoploid hybrid speciation（染色体数の変化を伴わない種分化）が報告された[2)]。これは自然界において異質 2 倍体由来の異質 1 倍体が発生し得ることを示唆している。今回、我々は、*Candida versatilis* と誤同定されていた t-1 株が異質 2 倍体 *Z. rouxii* に由来する異質 1 倍体であることを明らかにしたので報告する。
【方法】ゲノムデータは NCBI のホームページからダウンロードした。オルソログ遺伝子の検出は TBLASTN を用いてマニュアルで実施した。シンテニーを確認するため、Yeast Genome Annotation Pipeline で注釈付けを行った後、Yeast Gene Order Browser で解析した。
【結果】t-1 株と *C. versatilis* JCM5958 株のゲノムを比較したところ、両者の GC 含量に顕著な差があることを見出した。JCM5958 株の 26S rDNA D1/D2 領域は *C. versatilis* CBS1752^T 株のそれと 99%の相同性を示したが、t-1 株の D1/D2 領域は *Z. rouxii* CBS732^T 株のそれと 100%の相同性を示した。この結果は、t-1 株は *C. versatilis* よりも *Zygosaccharomyces* 属に近縁であり、t-1 株の同定が誤りである可能性を示していた。この可能性を検証するため、ゲノムワイドなシンテニーと相同性について確認を行ったところ、t-1 株が *Z. rouxii* に類似した 1 倍体であることが示唆された。t-1 株の起源及び系統的な位置を確認するため、14 個のオルソログ遺伝子にコードされたタンパク質の分子進化系統解析及びゲノム間の相同性の比較を実施した。その結果、t-1 株のゲノムは異質 2 倍体 *Z. rouxii* の両祖先に由来すると考えられる配列から構成されることが明らかとなり、t-1 株は異質 2 倍体 *Z. rouxii* の減数分裂又は染色体欠損により生じた異質 1 倍体であることが示唆された[3)]。

1) Watanabe *et al*., Appl. Environ. Microbiol. 83:21 (2017)
2) Leducq *et al*., Nat. Microbiol. 1: 15003 (2015)
3) Watanabe *et al*., Appl. Environ. Microbiol. In press (2018)

Zygosaccharomyces rouxii, hybrid, speciation

発表責任者：渡部潤（j_watanabe@yamasa.com）

講演番号：2A01p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A01 会場

ジグリセリンジカプリル酸エステルが *Candida albicans* に及ぼす影響

The influence of diglycerin dicapryl ester on *Candida albicans*

○小出 知次郎[1]、田村 宗明[2] ([1]理研ビタミン株式会社、[2]日本大学歯学部)
○Tomojiro KOIDE[1], Muneaki TAMURA[2] ([1]Riken Vitamin CO.,LTD., [2]Nihon Univ.)

バイオフィルムは微生物の存在様式のひとつで、日常生活のあらゆる場面に存在する。例えば排水口のヌメりや歯垢もバイオフィルムであり、コンタクトレンズや義歯、医療用カテーテルの表面に形成されることも知られている。バイオフィルムは悪臭や疾患発症の原因となることからその対策が望まれている。日和見感染症や菌交代症に関わる口腔に優勢な真菌のカンジダ菌 *Candida albicans* もバイオフィルムを形成する。しかし、バイオフィルム中の微生物には殺菌剤が効き難く、薬剤耐性菌の出現や菌交代症、副作用といった別の課題が生じる。そこでバイオフィルムの形成を抑制することが重要であると考え、さまざまな食品系素材をスクリーニングしたところ、ジグリセリンジカプリル酸エステル(DGDCE)に *C. albicans* のバイオフィルム形成に対して抑制効果があることを見出した。
C. albicans は二形性を示す酵母で、バイオフィルム形成の際に酵母形から菌糸形へ移行して病原性を発揮することが知られている。フローサイトメトリーにて解析したところ、DGDCE 存在下で *C. albicans* の菌糸化が抑制されていることを確認した。また *C. albicans* の生産するタンパク分解酵素（分泌型アスパルチルプロテアーゼ：Secreted Aspartyl Proteinase:SAP）も DGDCE 存在下で活性が低下する傾向がみられた。現在、メカニズム解明に向けた取り組みを実施中である。

diglycerin dicapryl ester, *Candida albicans*, biofilm

発表責任者：小出　知次郎（tom_koide@rike-vita.co.jp）

講演番号：2A01p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A01 会場

溶菌法による酵母への迅速なプラスミド導入系の開発

Application of yeast transformation by Cell Lysis Technology

○金子 真也[1]、中濱 みさ子[1]、福島 寛美[2]、板谷 光泰[3]([1]東工大・生命理工、[2]TRAHED、[3]慶應大・先端生命研)
○Shinya KANAKO[1], Misako NAKAHAMA[1], Hiromi FUKUSHIMA[2], Mitsuhiro ITAYA[3] ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology., [2]TRAHED, [3]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.)

自然界では DNA による遺伝情報のやり取り（水平伝播）が微生物間で頻繁に生じている。我々はプラスミド DNA が介在する「自然形質転換による水平伝播」に着目し、プラスミド DNA の抽出・精製操作を伴なわない自然に近い遺伝子伝搬法（導入法）として「溶菌法」（Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA; CELyTED）を開発した（1-3）。ある条件下で溶菌液中に安定して存在しうる細胞外核酸を用いた形質転換法であり、*in vitro* での生化学的な抽出・精製操作を必要としないため、迅速かつ簡便で、特に精製過程で物理的なダメージを受けやすい長鎖プラスミド DNA に効果的である（2）。

「溶菌法；CELyTED」の汎用性は非常に広く、自然形質転換能を持たない原核微生物の外、真核微生物である出芽酵母の形質転換法にも適用できることが確認された。

形質転換に直接用いる溶菌液の調整法として、これまでにヌクレアーゼ阻害剤（4）やタンパク質分解酵素（プロテネース K）による処理を施してきたが、界面活性剤（TritonX-100）を用いることで、出芽酵母の形質転換効率が飛躍的に上昇し、65kb までの長鎖 DNA を酵母細胞に効率良く導入できることが明らかになった。本講演では培地や界面活性剤などを用いた「溶菌法；CELyTED」の条件検討について報告する。

(1) Kaneko S. and Itaya M. (2010) ***J. Biochem.*** **147**: 819-822.
(2) Itaya M. and Kaneko S. (2010) ***Nucleic Acids Research*** **38:** 2551-2557.
(3) 金子真也、板谷光泰 (2016) ***化学と生物*** **54**, 668-673
(4) Kaneko S. et al. ***J. Biochem.*** (in press).

horizontal gene transfer, transformation, Cell lysis

発表責任者：金子　真也（skaneko@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2A01p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A01 会場

光触媒反応による真菌胞子へのダメージに与える胞子色素の影響

Influence of the spore pigment on the damage to fungal spores by photocatalytic reaction

○梶原 雄太郎[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大 応生、[2]東理大 総研)
○Yutaro KAJIWARA[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 近年、光触媒は有害物質を出さず、人体や環境への影響が少ない点から、殺菌剤に替わる殺菌方法として注目されている。真菌は細菌とは異なり、キチンや β-グルカンなどの多糖類から構成される強固な細胞壁を持っているため、光触媒による殺菌が難しいことが知られている。また先行研究では、真菌の菌種の違いや、色素の有無により光触媒反応による不活化効率に違いがみられた。しかし、光触媒による真菌の不活化メカニズムは解明されておらず、真菌に焦点を当てた光触媒の殺菌性能評価、および殺菌メカニズムの解明による真菌の効率的な殺菌方法の研究が重要な課題となっている。本研究では、真菌の菌種の違いや、色素の有無が光触媒反応に影響を与えるかどうかをより詳細に確認すると共に、光触媒反応による真菌の殺菌メカニズムの解明を目的として、*Aspergillus niger* JCM16264 の胞子、*Aspergillus oryzae* SG01 の胞子に対して TiO_2 コーティングガラスによる光触媒反応を作用させ、コロニー形成率推移の測定、細胞膜損傷の解析、細胞表面の構造観察を行った。
【方法】 日本工業規格（JIS）の JIS R-1702 に準じた評価系を構築し、各真菌に対して光触媒反応を作用させた。実験評価系から経時的に TiO_2 コーティングガラスを取り出して菌体を回収した後、コロニー計数法により各 UVA 照射時間における真菌の生存率を算出した。また、LIVE/DEAD™ *Funga*Light™ Yeast Viability Kit を用いた共焦点レーザー顕微鏡による観察により、非細胞膜損傷細胞の割合を算出した。さらに、卓上走査型電子顕微鏡（SEM）による細胞表面の構造観察を行った。
【結果】 コロニー計数法では、4 時間の光触媒処理で *A. niger* JCM16264 の胞子は約 80%、*A. oryzae* SG01 の胞子は約 43%に、8 時間の光触媒処理で *A. niger* JCM16264 の胞子は約 37%、*A. oryzae* SG01 の胞子は約 20%にコロニー形成率が低下した。LIVE/DEAD™ *Funga*Light™ Yeast Viability Kit による細胞膜損傷の解析では、光触媒処理 8 時間後の非細胞膜損傷細胞の割合が、*A. niger* JCM16264 の胞子で約 80%、*A. oryzae* SG01 の胞子は約 22%となった。SEM による細胞構造の観察では、表面に損傷を受けた胞子が観察できるまでに、*A. niger* JCM16264 の胞子は 8 時間、*A. oryzae* SG01 の胞子は 4 時間の光触媒処理時間を要した。それぞれの実験結果から、同じ *Aspergillus* 属の胞子でも、メラニン色素を持つ *A. niger* JCM16264 が、*A. oryzae* SG01 の胞子よりも光触媒反応による影響受けにくいことが示唆された。今後は光触媒による真菌不活化のより詳しい原因を調べるため、光触媒反応によって生じる過酸化脂質の定量を行うと共に、*A. oryzae* SG01 の胞子懸濁液にメラニン色素を添加して実験を行うことで、メラニン色素が光触媒反応に対して影響を与えているのかどうかをより詳しく調べる予定である。

photocatalysis, killing mechanism, fungus

講演番号：2A01p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A01 会場

細菌のペプチドグリカン層に対する光触媒反応の影響
The effect of the photocatalytic reaction to bacterial peptidoglycan layer
○髙尾 綾乃[1]、大嶋 佑治[1]、岡本 歩未[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大　応生、[2]東理大　総研)
○AYANO TAKAO[1], YUJI OHSHIMA[1], AYUMI OKAMOTO[1], AKIRA FUJISHIMA[2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】　消毒剤や抗生物質などを用いた一般的な殺菌は、高コストかつ人体への影響が懸念されるといった問題点がある。そこで、これらの問題点を解決する殺菌技術として光触媒効果が期待されている。光触媒による殺菌効果は、二酸化チタンに紫外線を照射することで産生する活性酸素種の強い酸化力によるものである。しかし、この殺菌メカニズムについては未だ明確な知見が得られていない。グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌よりも殺菌効果が低いという報告がある一方で、活性酸素種はペプチドグリカン層を通過し、外膜や内膜のみで反応が起こるという報告があることから、グラム陽性細菌の方が殺菌されやすいのではないかとも考えられる。以上のように、細胞壁に対する光触媒反応には相反する報告が存在しているのが現状である。そこで本研究では、芽胞を形成しないグラム陽性細菌である *Lactobacillus plantarum* JCM1149^T と、そのプロトプラスト細胞、そして細胞壁を持たない *Mesoplasma florum* NBRC100688^T に対して光触媒反応を行った後、BacLight 蛍光試薬による膜損傷率評価を行い、それぞれの死滅速度の違いに着目することでペプチドグリカン層の光触媒反応への影響を探ることを目的とした。
【方法】　プロトプラスト細胞は、細胞壁融解酵素で処理してペプチドグリカン層を無くしているため、浸透圧変化に非常に敏感であるゆえに作製するのが難しい。これまでも最適な作製条件を見つけるために作製条件の検討を行ってきたが、今回最もプロトプラストが形成できる条件が得られた。そこで、この最適条件に基づいて作製した *L. plantarum* JCM1149^T のプロトプラスト細胞と未処理細胞に対して BacLight 蛍光試薬を添加し、TiO_2 コーティングガラス上で UVA を照射して光触媒反応を行った。また、ペプチドグリカン層を人為的に無くした細胞と、そもそも元から無い細胞とで違いが見られるのかを確認するために、*L. plantarum* JCM1149^T と同様の方法で *M. florum* NBRC100688^T に対しても光触媒反応を行った。
【結果】　これまでの我々の研究により、プロトプラスト細胞の方が未処理細胞よりも光触媒反応後の膜損傷率が低いのではないかという知見が得られ、ペプチドグリカン層が光触媒反応に何らかの形で関与している可能性が示唆された。そこで、このことを確実に検証するために、今回さらに回数を増やして実験を行った。また現在、新たに *M. florum* NBRC100688^T を用いた実験も追加して行っている。そこで今回は、*M. florum* NBRC100688^T に対しても膜損傷率評価の解析を進め、ペプチドグリカン層の有無によって光触媒反応に違いが見られるのかをより詳細に解析し、報告する予定である。

photocatalysis, killing mechanism, protoplast

講演番号：2A01p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A01 会場

生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond (BDD)電極併用汚水浄化システムの構築と評価
Analyses of hybrid wastewater purification system using biological treatment, photocatalyst and boron-doped diamond electrode (BDD)

○井手口 真理[1,3]、佐藤 俊貴[1]、落合 剛[2,3]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[2,3] ([1]東理大 応生、[2]東理大 総研、[3]KISTEC)
○ MARI IDEGUCHI[1,3], TOSHIKI SATO[1], TSUYOSHI OCHIAI[2,3], AKIRA FUJISHIMA[2,3], TOMONORI SUZUKI[2,3] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Photocatalysis International for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Techinology)

〔目的〕 生活汚水による生態系への悪影響を防ぐため、さまざまな汚水処理の技術が存在するが、コストや有害物質の発生といった問題が指摘されている。これらの問題を解決する手段として、光触媒による酸化反応や boron-doped diamond (BDD)電極を利用した技術などが注目されている。そこで本研究では、汚水に含まれる有機物や微生物の処理に有効な光触媒および BDD 電極を生物学的処理後の処理水のさらなる浄化処理に利用することで、より低コストで環境への負荷の少ない汚水処理システムを構築することを目的とした。

〔方法〕 まず、殺菌性能を評価するために、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis* 懸濁液に対して、酸化チタンに UVA を照射して生じる光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応をそれぞれ作用させた。そして、一定時間ごとに細菌懸濁液を回収し、コロニー計数法により経時的な生菌数の減少を計測した。また、本システムの有機物分解能を評価するため、光触媒反応・BDD 電極反応をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに全有機炭素量(TOC)を測定した。さらに、16S rRNA 遺伝子に対して、生細胞由来の DNA のみを増幅することができる viability PCR による増幅を行い、光触媒・BDD 電極併用処理前後の処理水中の細菌叢変動解析を行う事で、本システムで殺菌できない細菌（耐性菌）が存在するか検証した。

〔結果〕 本研究では、生物学的処理と光触媒反応、BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応を併用したハイブリッド式汚水浄化システムの構築に向けた、殺菌性能および有機物分解能の評価を行った。その結果、*E. coli* と *B. subtilis* を用いた殺菌性能の評価において、BDD 電極を単独で作用させた場合および光触媒と BDD 電極を併用した場合では、反応開始 1 時間後に *E. coli* の約 99.9 %が、反応開始 8 時間後に *B. subtilis* の約 99.9 %が死滅した。また、循環型浄化槽に定着した微生物群の有機物分解能評価の結果、7,000 mg/L であった有機物量が約 48 時間で 1,500 mg/L まで減少し、循環型浄化装置の有効性が確認された。その生物学的処理水に対して光触媒反応および BDD 電極反応をそれぞれ作用させたところ、光触媒と BDD 電極を併用した場合に特に高い有機物分解能を示すことが分かった。現在、生物学的処理水に対して光触媒と BDD 電極を併用して処理を行った場合の処理前後の細菌叢変動解析を行っている。そして、Viability PCR 法によって得た増幅産物を、第 3 世代シーケンサーMinION を用いて解析した結果と合わせて報告する予定である。以上の結果から、光触媒による酸化反応と BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応を利用した本システムが、より高い殺菌性能および有機物分解能を発揮する事が示唆された。

wastewater prification, photocatalyst, boron-doped diamond electrode

発表責任者：井手口真理（6416607@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2A01p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A01 会場

エタノールと光触媒により生成した有機過酸化物による芽胞菌死滅の機構解明
Sporicidal Mechanism by Organic Peroxide Generated by Photocatalysis in the Presence of Ethanol

○石岡 瞬[1,2]、山口 友一[1,2]、佐久間 貴大[2]、勝又 健一[1]、寺島 千晶[1]、藤嶋 昭[1]、鈴木 智順[1,2]、大和屋 健二[2]、中田 一弥[1,2] ([1]総合研究院 光触媒国際研究センター、[2]東京理科大学)
○ Shun ISHIOKA[1,2], Yuichi YAMAGUCHI[1,2], Takahiro SAKUMA[2], Ken-ichi KATSUMATA[1], Chiaki TERASHIMA[1], Akira FUJISHIMA[1], Tomonori SUZUKI[1,2], Kenji YAMATOYA[2], Kazuya NAKATA[1,2] ([1]Research Institute for Science and Technology, Photocatalysis International Research Center, [2]Tokyo University of Science)

〔目的〕人体の健康に悪影響を及ぼす原因の一つに微生物によるものがある．中でも，芽胞形成菌(以下，芽胞と略す)は不活化が困難な微生物として知られる．これまで芽胞を死滅させる消毒剤として過酸化物の一種である過酢酸が使用されてきた．しかし，高濃度過酢酸は劇物に指定されており，生体への危険性が強く懸念される．一方，生体に安全な環境浄化材料として光触媒が注目を集めている．光触媒として知られる酸化チタンは光を照射すると活性酸素種を生成し，菌やウイルスを不活化することが知られている．しかし，酸化チタンから発生する活性酸素種をもってしても芽胞を不活化することは困難であった．最近，当研究室では，光触媒の酸化還元反応を利用して生体安全性が高いアルコール消毒剤から有機過酸化物を生成することで,芽胞を不活化できることを報告した.また光触媒を利用して生成した有機過酸化物は，同濃度の過酢酸単体を用いた場合に比べて優れた不活化性能を示す興味深い結果が得られた.しかし光触媒を用いて生成した有機過酸化物がなぜ過酢酸単体よりも優れた不活化性能を示すのかは明らかになっていない．そこで，本研究では上記の芽胞不活化の機構解明を目的とした.

〔方法〕枯草菌芽胞菌液（2.0×10^7 CFU/mL,または 1.0×10^9 UFU/mL）と 80%エタノール，超純水をそれぞれ混合し，過酢酸を各量添加し撹拌した．その後，各処理時間における芽胞の生存率をコロニー計測法によって求めた．60 分処理した芽胞を *Bac*Light™によって染色し，共焦点レーザー顕微鏡を用いて励起光 488，533 nm で観察し膜損傷の有無を確認した.

〔結果・考察〕31.9 ppm の過酢酸水溶液を用いた場合では芽胞の不活化は見られなかった．一方，80%エタノール含有過酢酸水溶液では過酢酸濃度が約 25 ppm，約 50 ppm の場合に芽胞が不活化され，約 50 ppm では 30 分で不活化したことを確認した．一方，80%エタノールで前処理し，次に過酢酸水溶液で処理した場合には芽胞の生存率の低下が確認できなかった．このことから，効果的な芽胞の不活化にはエタノールと過酢酸の共存が必要であることが示唆された.また共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果，80%エタノールのみで処理した芽胞，および 80%エタノール含有過酢酸水溶液で処理した芽胞はいずれも菌全体に膜損傷が観察された．一方で，超純水で処理した芽胞では膜損傷が観察されなかった．80%エタノール単独処理の芽胞菌でも膜損傷したため，膜損傷が芽胞の不活化の直接的な原因とは断定できないが，膜損傷が過酢酸の芽胞菌内部への浸透性に寄与している可能性があると考察した.

Spore, Photocatalysis, Peracetic acid

発表責任者：石岡瞬（6414007@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2A01p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A01 会場

簡便なペクチン分解活性評価法に関する研究

Innovative evaluation method for pectin degradation

○石原 真以[1]、吉川 真広[2]、清水 一憲[2]、鈴木 宏昭[1]、本多 裕之[2,3]([1]トヨタ紡織（株）、[2]名大院工、[3]名大・予防早期医療創生セ)
○Mai ISHIHARA[1], Masahiro KIKKAWA[2], Kazunori SHIMIZU[2], Hiroaki SUZUKI[1], Hiroyuki HONDA[2,3] ([1]Toyota boshoku Corporation, [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]PME, Nagoya Univ.)

【背景と目的】

自動車への「二酸化炭素排出削減」、「環境負荷低減」が求められる中、自動車部品の植物材料化が注目されている。植物材料の一つとして、生長が早く、二酸化炭素吸収能力が高い一年草植物のケナフに着目し、ケナフ繊維を用いた基材による内装品が提供されている。ケナフの繊維化は繊維同士を架橋するペクチンを微生物で分解する工程を要する。分解工程はレッティングと呼ばれ、ケナフの生産地であるインドネシアなどでは、川や池などにケナフを長期間浸漬して腐食させ、水中の微生物によってペクチンを分解している。自然環境中の多様な微生物からペクチン分解に関わる有用な微生物を効率よく取得するため、ペクチン分解活性を簡便に評価する方法が必要である。

我々は、ペクチンが冷却により白濁する現象を見出した。本研究では、ペクチンの白濁を利用しペクチン分解活性を評価した結果を報告する。

【方法】

ペクチンを主な炭素源とした寒天平板培地を作製した。植物繊維のレッティングにはアルカリペクチナーゼが利用されているため、ペクチンの濃度に併せて pH を調整した。作製した平板培地に試料を接種し各温度で反応後、4℃で冷却しペクチンを白濁させ分解活性を評価した。

【結果】

作製した平板培地は微生物を培養する温度 20~40℃では透明だが、4℃以下に冷却すると、ペクチンを含まない培地は変化せず、ペクチンを含む培地は白濁した。

ペクチン分解酵素 (PECTIN LYASE from Aspergillus sp., Megazyme)を種々の濃度に調整し、平板培地に接種、40℃で一晩静置した。平板培地を冷却し、現れたハローの大きさを計測した。酵素濃度とハローの大きさに相関関係があったことから、本方法で分解活性評価が可能であることを確認した。

次に、ペクチン分解微生物として、*Bacillus halodurans* (C-125 株)を使用した。C-125 株はアルカリペクチナーゼを生産する微生物として最も良く研究されている。希釈平板法を参考に希釈率を調整した懸濁液を塗抹法により培地に広げ、37℃で一晩静置培養した。冷却後、コロニー周辺がハローとして可視化された。

Pectinolysis, Alkalophilic bacteria, Halo assay

発表責任者：石原真以（mai.ishihara@toyota-boshoku.com）

講演番号：2A02a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A02 会場

食品微生物検査へのジェランガム培地適用の検討

Microbial analyses of foods using gellan gum plate media

○細井 知弘、佐藤 万里（東京都立食技セ）
○Tomohiro HOSOI, Mari SATO (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【目的】 多糖類ジェランガム gellan gum は，培地成分として，微生物の分離・培養，植物の組織培養，人工多能性幹細胞（iPS cell）の三次元培養に利用されている。一方，通常，培地作製に用いられる寒天と原藻については，それらの不足・高騰が話題となっている。寒天の代替成分としてジェランガムを添加した培地を食品の微生物検査に用いた際には，1）寒天培地とジェランガム培地とで微生物の生育が異なり，ときに培養・検査結果に差異が生じること，2）強酸性食品試料，高温細菌に関する検査がより容易に実施可能となることなどが見込まれる。本研究では，複数の液体基礎培地を用いて作製したジェランガム培地を用いて，種々の微生物を塗抹培養した際のコロニー性状の検討，および数種の食品等についての菌数検査を行ない，寒天培地による結果と比較した。
【方法】 液体基礎培地として，Trypticase Soy Broth（BBL），寒天を除いた標準寒天培地組成液体培地（Trypticase Peptone（BBL）, Yeast Extract（BBL）, Dextrose（Difco）混合），および Potato Dextrose Broth（Difco）の 3 種類を用いた。また，ジェランガムとして，Gelrite（Wako）および Phytagel（Merck）を用い，寒天として，Agar, Powder（Wako）および Agar（Bacto）を用いた。液体基礎培地，ジェランガム，寒天それぞれを別々にオートクレーブ後に混合し（ジェランガムの最終濃度 5 - 15 g/L，寒天の最終濃度 15 g/L），微生物株と食品等について，平板塗抹培養および混釈培養を行った。また，対照の既製寒天培地として，標準寒天培地および Potato Dextrose 寒天培地（栄研化学）を用いた。
【結果】
1. 大腸菌，緑膿菌，黄色ブドウ球菌などの微生物株を，Trypticase Soy Broth を基礎培地とする培地表面に平板塗抹培養したところ，ジェランガム添加培地と寒天添加培地とで，出現コロニー数は同様であるものの，菌種に依存して，ジェランガム濃度が低い場合にコロニー径が大きくなる傾向が認められた。
2. 標準寒天培地と Potato Dextrose 寒天培地（抗生物質未添加）の組成に準じて，ジェランガムおよび寒天を添加して調製した培地，およびそれぞれの既製寒天培地を用いて，おから，もやし，米麹について，混釈または平板塗抹培養により菌数検査を実施した。その結果，ジェランガム添加培地・寒天添加培地・既製寒天培地間で，結果が類似しているケースと，異なっているケースとが存在した。
また，結果 1 および 2 において，使用したジェランガムの製品間にて，生育する微生物の種類，および糸状菌のコロニー性状に差異が認められるケースも存在した。

gellan gum plate medium, microbial analysis of food, agar plate medium

講演番号：2A02a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A02 会場

北海道東沖海底堆積物より取得した低温性微生物の解析

Psychrophiles isolated from marine sediment in the eastern offshore of Hokkaido

○田島 誉久[1]、鴨木 明子[1]、小西 正朗[2]、八久保 晶弘[2]、坂上 寛敏[2]、南 尚嗣[2]、山下 聡[2]、中島田 豊[1]、加藤 純一[1] ([1]広島大院先端、[2]北見工業大工)
○Takahisa TAJIMA[1], Akiko KAMOGI[1], Masaaki KONISHI[2], Akihiro HACHIKUBO[2], Hirotoshi SAKAGAMI[2], Hirotsugu MINAMI[2], Satoshi YAMASHITA[2], Yutaka NAKASHIMADA[1], Junichi KATO[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kitami Inst. Technol.)

【目的】

これまでに効率的な物質変換触媒を構築するため，中温性酵素を有効活用できる物質変換触媒（シンプル酵素触媒）の構築を行っている．シンプル酵素触媒とは，中温性酵素を低温菌にて異種発現し，これを中温で熱処理・反応することにより宿主である低温菌代謝酵素による副産物生成を排除した効率的な変換を目的とする触媒である．しかし，低温菌の増殖速度は大腸菌に比較して低く，より高い増殖能を持つ低温菌が宿主として期待される．そこで本研究では，低温環境の一つである北海道沖海底の堆積物より低温性微生物を単離し，有用微生物を見いだすことを目的とする．触媒宿主や新規な遺伝子発現機構を探索するために低温性微生物の取得を行った．本発表ではその取り組みと成果について報告する．

【方法・結果】

北海道大学練習船おしょろ丸によりオホーツク海網走沖，太平洋十勝沖においてコアリングにより採取された海底堆積物をマリン培地，二価金属塩（Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}）を別に添加したマリン培地，炭素源としてマンニトールやグルコースなどを添加した培地にそれぞれ接種した．出現したコロニーを 37℃と 18℃で培養し，18℃で生育したコロニーのみを取得し，解析を行った．16S rRNA 配列解析よりマリン培地から取得されたコロニーのうち増殖の早いものは *Shewanella* 属，*Viblio* 属，*Aliiviblio* 属などの微生物種であった．また，18℃にて半回分連続培養を行い，増殖能の高い低温性微生物の取得に取り組んでいる．

興味深いことに塩化マンガンを添加した培地からは紫色を呈するコロニーが特徴的に得られた．いずれのコロニーも 16S rRNA 配列解析から *Pseudoalteromonas* 属であった．産生された紫色色素をエタノールにて抽出し，LC-MS/MS にて解析したところビオラセインであった．取得された株についてビオラセインの生成量の比較やマンガン添加によるビオラセイン生成への影響などについて検討を行っている．

本研究は，北見工業大学により実施されたおしょろ丸道東沖ハイドレート調査実習の一環として行われた．また，本研究の一部は発酵研究所一般研究助成によるものである．

Psychrophiles, Violacein, Marine sediment

発表責任者：田島誉久（ttajima@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A02a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A02 会場

カルチャーコレクションに眠っている金属腐食性微生物の探索
Screening of iron-corrosive microorganisms from microbial culture collection

○若井 暁[1]、飯野 隆夫[2]、伊藤 隆[2]、大熊 盛也[2] ([1]神戸大院イノベ、[2]理研 BRC-JCM)
○Satoshi WAKAI[1], Takao IINO[2], Takashi ITOH[2], Moriya OHKUMA[2] ([1]Kobe Univ., [2]RIKEN BRC-JCM)

微生物が金属材料の腐食現象に関わることは、微生物腐食と呼ばれている。金属材料の腐食問題は、設備の維持管理に関わるコストの面に加えて、石油関連施設や化学工場での腐食事故に伴う石油や化学薬品の漏洩による環境汚染という側面も抱えている。これまで、微生物腐食の主役は硫酸塩還元細菌（特に *Desulfovibrio* 属細菌が腐食原因菌として有名）と考えられてきたが、硫酸塩還元細菌が存在する環境でも微生物腐食が観察されなかったり、硫酸塩還元細菌の存在比が顕著に低い環境で腐食現象が観察されたりするため、他の微生物による影響を考える必要性が生じていた。21 世紀に入ってから、多くの新規金属腐食性微生物（鉄腐食性メタン生成菌、鉄腐食性硝酸塩還元細菌、鉄腐食性酢酸生成細菌、鉄腐食性鉄酸化細菌、ヨウ素酸化細菌など）が見つかってきており、金属腐食性微生物のポテンシャルは質と量共に未だ明らかになっていない。
環境中の多くの微生物の金属腐食能力は未知数であり、環境要因と微生物種の組み合わせを考慮しながら金属腐食能力を評価することは現実的に無理である。しかし、少なくとも培養可能な既知微生物の金属腐食能力であれば、評価可能である。そこで、本研究では、理化学研究所 JCM (Japan Collection of Microorganisms) が保有する大量の微生物株の中から、基準株を対象に簡易培養試験による金属腐食能の評価を行い、既知微生物群に潜伏している金属腐食性微生物の洗い出しを行うこととした。各微生物株を、JCM 指定の培地、あるいは、代替可能な培地を用いて前培養し、十分な生育が確認できた菌株について各培地に純鉄試験片（Fe＞99.9%、10×10×0.1 mm）を投入した腐食試験用培地に植え継いだ。37℃あるいは 50℃で静置培養を行い、14 日目までの鉄溶出量を *o*-フェナントロリン法により測定した。金属腐食能は、同条件での無生物的な鉄溶出量よりも二倍以上高い鉄溶出量を示した場合に金属腐食性ありと定義づけた。
現在までに、*Clostridia* 綱や *Bacilli* 綱に属する嫌気性細菌やメタン生成アーキアを含む約 250 株の微生物株について金属腐食能の調査を行い、これまで金属腐食能が報告されていない微生物株から金属腐食能を確認した。例えば、*Clostridium cadaveris* JCM 1392 は、無菌区よりも 4.7 倍の鉄溶出量を示した。同時に検討した他の *Clostridium* 属細菌ではこのような加速された鉄溶出が生じておらず、近縁種の中でも *C. cadaveris* JCM 1392 株が特異的に金属腐食能を持っていると言える。
今後は、カルチャーコレクション保有株に対する金属腐食性微生物の洗い出しを継続すると共に、新規に見つかった金属腐食性微生物の腐食メカニズムの解明にも取り組む。

microbiologically influenced corrosion, biocorrosion, Clostridium

発表責任者：若井暁（wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2A02a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A02 会場

スクロース構造類似二糖による腸内細菌の増殖

Proliferation of enterobacteria by sucrose-mimic disaccharides

○保坂 浩貴[1]、平野 菜摘[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化）
○Hiroki HOSAKA[1], Natsumi HIRANO[2], Takako HIRANO[1,2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】当研究室では、スクロースのグルコース残基が様々な単糖へと置き換わった、スクロース類似構造を有するオリゴ糖の合成と、それらのプレバイオティクスとして評価のための腸内細菌による資化性試験を行なっている。

我々はこれまでに、*Aspergillus oryzae* や *Microbacterium saccharophilum* が生産するβ-フルクトフラノシダーゼの糖転移作用を利用して、スクロース（図 1 A）のグルコース残基をグルコサミン、*N*–アセチルグルコサミン、グルクロン酸、およびグルクロン酸アミドに置換したスクロサミン（図 1 B, SucN）、*N*-アセチルスクロサミン（図 1 C, SucNAc）[1,2]、スクロン酸（図 1 D, SucA）、およびスクロン酸アミド（図 1 E, SucAm）[3]を合成した。

現在、我々は、これら 4 種類のスクロース類似構造糖の腸内細菌に対する増殖効果を調べている。本発表では、これまでに得られた結果を報告する。

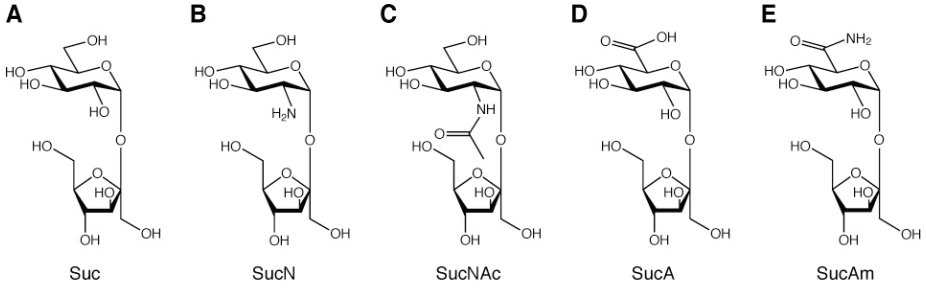


図 1.スクロースと酵素反応を利用したスクロース構造類似二糖

【方法・結果】Bifidobacterium 属と Lactobacillus 属の細菌を GAM 培地にて培養後、生理食塩水で洗浄して前培養液由来のグルコースを除去した後、96 ウェルプレートを用い、各オリゴ糖の終濃度が 30 mM になるように調節した MRS 培地にこれを添加し培養を行った。菌体の増加量は、マルチプレートリーダーを用いて OD_{655} における菌体濁度を測定し調べた。なを、スクロースをポジティブコントロールとして用いた。その結果、Bifidobacterium 属と Lactobacillus 属細菌共に、各スクロース類似構造糖に対する資化性はスクロースと比較して低かった。しかし、*Bifidobacterium adolescentis* は SucAm を特異的に資化することが確認できた。また、*Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* では、合成した全てのスクロース類似構造糖を資化できることが確認できた。このことから、Bifidobacterium 属細菌によるオリゴ糖の資化には種による特異性があることが示唆された。

1) T. Hirano, T. Nishio *et al*, *Carbohydrate Research*, **353**, 27-32 (2012)
2) H. Sato, T. Nishio *et al*, *Journal of Applied Glycoscience*, **59**, 153-160 (2012)
3) M. Saori, T. Nishio *et al*, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **35**, 435-444 (2016)

sucrose-mimic disaccharide, probiotics, Bifidobacteria

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A02a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A02 会場

ハチミツに含まれるオリゴ糖のビフィズス菌による資化性

Utilization of honey oligosaccharides by bifidobacteria

○大坪 和香子、澤田 侑希、北澤 春樹、齋藤 忠夫（東北大農）
○Wakako Ikeda-Ohtsubo, Yuki Sawada, Haruki Kitazawa, Tadao Saito (Tohoku Univ.)

ハチミツには複数種のオリゴ糖が含まれており、ビフィズス菌などの腸内細菌の増殖促進効果を有するプレバイオティクスとして機能性食品への応用が期待されている。フルクトオリゴ糖（FOS）やガラクトオリゴ糖はプレバイオティクスとして広く知られているが、ハチミツに含まれるオリゴ糖の組成やプレバイオティクスとしての機能に関する知見は未だ乏しい。本研究では、由来の異なるハチミツからオリゴ糖を分析・分取し、その組成およびビフィズス菌による利用性を試験することにより、ハチミツオリゴ糖のプレバイオティクスとしての特性を明らかにすることを目的とした。甘露、レンゲおよびそばを蜜源とするハチミツから、活性炭末吸着法により単糖および二糖を除去し、減圧蒸留により濃縮した濾液をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画後、各画分中のオリゴ糖を薄層クロマトグラフィー(TLC)分析により確認した。甘露、レンゲおよびそばハチミツから分取したハチミツオリゴ糖は、それぞれ組成が異なっていたが、特に花由来（レンゲおよびそば）ハチミツと甘露（昆虫が収集した樹液由来）のオリゴ糖組成に大きな違いが見られた。各オリゴ糖画分を唯一の炭素源として与えた際に、ビフィズス菌株において濁度の顕著な上昇や pH の低下が認められ、プレバイオティクスとして認められている FOS と同等の生育促進効果があることが明らかになった。特に、甘露ハチミツに含まれるオリゴ糖に対して高い資化性が認められたことから、今後甘露ハチミツのプレバイオティクス効果に期待が持たれる。

honey, bifidobacteria, oligosaccharides

発表責任者：大坪和香子（wakako.ohtsubo@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A02a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A02 会場

亜リン酸を利用したシアノバクテリアの新規生物学的封じ込め手法の開発

A novel biological containment system for genetically engineered cyanobacteria based on phosphite auxotrophy

○本村 圭[1,2]、廣田 隆一[1,2]、佐野 公亮[1]、神原 亮大[1]、桂浦 善一朗[1]、堀川 凌平[1]、渡辺 智[2,3]、池田 丈[1]、石田 丈典[1]、舟橋 久景[1]、黒田 章夫[1,2] ([1]広島大院・先端物質、[2]JST-ALCA、[3]東京農大・生命科学)

○Kei MOTOMURA[1,2], Ryuichi HIROTA[1,2], Kosuke SANO[1], Akihiro KANBARA[1], Zen-ichiro KATSUURA[1], Ryohei HORIKAWA[1], Satoru WATANABE[2,3], Takeshi IKEDA[1], Takenori ISHIDA[1], Hisakage FUNABASHI[1], Akio KURODA[1,2] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA, [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】微細藻類は植物に比べて増殖が速く、二酸化炭素を固定しながら様々な有用物質を合成できるため、環境負荷の少ない物質生産のため宿主として注目されている。遺伝子組換え技術の発展を受け、様々な有用形質を持つ組換え藻類が開発され商業化が期待されているが、物理学的な封じ込めが困難な屋外培養では組換え株使用の承認を得ることが難しいため、強固で実用的な生物学的封じ込め手法の導入が望まれている。当研究室では、環境中にほとんど存在しないリン源である亜リン酸に生育を依存するように代謝を改変することで、世界最高レベルの封じ込め効果を示す大腸菌株の作製に成功している。そこで本研究では、原核微細藻類であるシアノバクテリアにその手法を適用し、亜リン酸を利用した組換え藻類封じ込めのための基盤技術の確立を目指した。
【方法・結果】シアノバクテリアのモデルとして *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株を用いた。亜リン酸を利用した封じ込めには、①亜リン酸酸化酵素 PtxD による亜リン酸資化能の付与、②リン酸を取り込まない亜リン酸輸送体の機能的発現、③内在性リン酸関連輸送体遺伝子の破壊が必要となる。亜リン酸資化能の付与は、*Ralstonia* 由来 *ptxD* 遺伝子を導入することで達成した。次に、様々な菌株から亜リン酸輸送体のホモログ遺伝子をクローニングし、PCC 7942 で機能的に発現する亜リン酸輸送体を選抜した。その結果、シアノバクテリア由来を含む複数の亜リン酸輸送体 PtxABC および変異型次亜リン酸輸送体 HtxBCDE が PCC 7942 で機能的に発現することがわかった。そこで、これらの輸送体の亜リン酸特異性を調べるため、各輸送体導入株における内在性リン酸輸送体の破壊を試みた。PCC 7942 でアノテーションされている 2 種類のリン酸輸送体遺伝子（*pit*、*sphX-pstSCAB*）を破壊した結果、複数の亜リン酸輸送体が亜リン酸に対する高い特異性を示すことを見出した。また、これらの株は亜リン酸輸送体の非誘導条件下ではリン酸を資化できなかったことから、PCC 7942 の内在性リン酸関連輸送体がこれら 2 種類のみであることが明らかとなった。現在、作製した株の封じ込め効果を評価している。

cyanobacteria, biological containment, phosphite

講演番号：2A02a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A02 会場

発芽能のある大豆は納豆菌の増殖を抑制する
Germinable soybean represses growth of *Bacillus subtilis*
○杉浦 春香[1]、村田 幸作[2]、橋本 渉[1] ([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
○Haruka SUGIURA[1], Kousaku MURATA[2], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad.Sch.Agric.,Kyoto Univ, [2]Fac.Sci.Eng.,Setsunan Univ)

【背景と目的】納豆は、大豆を用いた我が国の伝統的な発酵食品の一つである。美味しい納豆を製造（発酵）するためには、納豆菌（*Bacillus subtilis*）による大豆成分の認識・取り込み・分解・代謝に関わる分子機構を理解することが重要である。細菌と植物との相互作用様式には、共生、感染、及び腐生の三種類が存在する。納豆菌はイネ藁などの枯れた植物体に存在し、その植物腐生性を利用して納豆が製造されている。原料である大豆は蒸されているため、既に発芽能を喪失し枯死体となっている。蒸し大豆表面に納豆菌が増殖していくが、大豆に対する納豆菌の分子応答には不明な点が多い。そこで、本研究では、大豆に対する納豆菌の増殖特性と分子応答、並びに大豆による納豆菌への作用を解析することにより、納豆菌と大豆との相互作用を分子レベルで明らかにすることを目指す。
【方法と結果】大豆は、納豆製造に好適な小粒の北海道産スズマルを購入した。購入直後の新鮮な大豆は発芽能を示すが、常温で数カ月保存した大豆では発芽能が自然に消失する。そのため、それぞれを発芽能ありと発芽能なしの大豆として用いた。納豆菌（NBRC16449株）は、製品評価技術基盤機構より購入した。大豆を水に浸漬し、吸水させた後、納豆菌を接種し、37℃で保温した。経時的に大豆表面に存在する納豆菌を生理食塩水で洗い出し、その菌懸濁液をLB寒天培地に塗布・培養した後、生育するコロニー数を計測することにより、大豆上の納豆菌の増殖曲線を作成した。その結果、発芽能なしの大豆では、納豆菌は良好に生育し、48時間後には菌膜の形成と粘性物質の分泌が確認できた。一方、発芽能ありの大豆は、発芽能なしの大豆と比較すると、納豆菌の増殖を顕著に（百分の一程度まで）抑制し、大豆表面に菌膜の形成は認められなかった。発芽能ありの大豆表面にもともと付着している微生物の影響を排除するため、紫外線照射により発芽能は欠損させず、大豆表面の微生物のみを滅菌した。同様に、紫外線照射した大豆上での納豆菌の増殖を調べた結果、やはり納豆菌の増殖は抑制された。また、発芽能ありの大豆は、枯草菌（*B. subtilis* 168株）の増殖も抑制した。
　発芽能なしの大豆に生育する納豆菌の転写産物を解析した結果、大豆細胞壁成分の分解や輸送に関わる酵素やタンパク質の遺伝子が発現していることがわかった。
【考察】本研究により、納豆菌と枯草菌は発芽能を示す大豆よりも枯死体を栄養源とし、*B. subtilis* の腐生性が改めて示された。また、発芽能ありの大豆は納豆菌を認識し、その増殖を抑制する物質を分泌産生することが示唆された。
　本研究の一部は不二たん白質研究振興財団の支援を受けて行われた。

Bacillus subtilis, natto, soybean

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A02a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A02 会場

永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析
Resistances of high-persister-forming mutants to antimicrobial agents and environmental stresses and identification of their mutations.
○安岡 甫[1]、平山 彩[1]、紅谷 貴之[2]、中田 訓浩[3]、松村 由信[1,3]（[1]関西大・生命生物工、[2]関大院・生命生物工、[3]関西大・ORDIST）
○Hajime YASUOKA[1], Aya HIRAYAMA[1], Takayuki BENITANI[2], Kunihiro NAKATA[3], Yoshinobu MATSUMURA[1,3] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol., Kansai Univ., [2]Dept. Life Science & Biotechnol., Grad. Sch. Kansai Univ., [3]ORDIST, Kansai Univ.)

〔目的〕公衆衛生や清潔志向への関心の高まりから、高い安全性と抗菌力を示す微生物制御法の開発が望まれる。一方で、新規抗菌剤に対する耐性株が比較的早く出現し、耐性細胞の効果的な微生物制御法の開発も求められる。耐性細胞には近年多くの微生物で確認されている休眠型細胞である永生細胞（persister cell）も含まれる。これまでの研究で、抗菌性陽イオン性界面活性剤（臭化セチルトリメチルアンモニウム塩[CTAB]）に耐性を示す自然突然変異株大腸菌 OW66 株がスーパーオキシドストレス耐性に関わる遺伝子変異により耐性化していることを見出し、これとは別に単離した CTAB 耐性株では永生細胞を高頻度で形成する変異株が含まれていた。本研究は永生細胞高出現株の抗菌剤耐性能の評価とその対策を検討した。
〔方法〕大腸菌野生株 OW6 株と CTAB 馴化培養で得られた CTAB 耐性変異株（OW66 株、L-50 株、L-100 株、L-200 株、L-300 株、L-410 株、L-540 株）を用いた。抗菌剤耐性評価は最小発育阻止濃度（MIC）法で行った。抗菌剤には CTAB を含む第四アンモニウム塩や抗生物質を用いた。細胞の耐熱性は 50℃処理後の生残細胞数をコロニーカウント法で測定し評価した。細胞内スーパーオキシド発生は Dihydroethidium 染色法で確認した。永生細胞は 30 分間の 100μM CTAB 処理で生残する細胞とした。変異株の変異部位決定には次世代シーケンサーMiSeq（illumine 社)を用いた。
〔結果〕変異株の抗菌剤耐性能を MIC 法で評価すると調べたほとんどの抗菌剤に対して耐性を示した。50μM CTAB 処理におけるスーパーオキシド発生を検証した結果、L-540 株で発生率が約 2%、L-50 株では 80%となり、スーパーオキシド発生抑制が CTAB 耐性化に寄与していると考えられた。変異株における永生細胞形成率を測定した結果、OW66 株を除いて、対数増殖期後期で高い永生細胞形成率が確認され、永生細胞形成率が高い変異株で高い CTAB 耐性を示した。一方、永生細胞の熱耐性は低いものであった。変異株の変異部位を調査した結果、一部の永生細胞高形成変異株で antitoxin 遺伝子 *sohA*（*pr1F*）に変異が確認された。SohA は細胞増殖抑制や永生細胞への移行を誘発する YhaV リボヌクレアーゼ（toxin）活性と *yhaV-sohA* 遺伝子発現を抑制し、*sohA* 変異は YhaV の活性化に寄与しているものと予想された。今後、トランスクリプトーム解析で toxin-antitoxin 遺伝子やスーパーオキシド消去に関わる遺伝子の発現挙動の解析し、抗菌剤耐性株の微生物制御システムの開発につなげる予定である。

multi-drug resistance, persister cell, reactive oxygen species

講演番号：2A02a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A02 会場

好気性従属栄養細菌株由来の極貧栄養環境での生育能を獲得した突然変異株の解析
Oligotrophic mutants derived from an aerobic heterotrophic bacterial strain
○稲葉 慎之介、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大学・大学院生命科学研究科）
○SHINNOSUKE INABA, HIROMI KATO, YOSHIYUKI OHOTSUBO, MASATAKA TSUDA, YUJI NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】従属栄養細菌にとって自然環境の多くは極貧栄養状態であり、細菌は、そのような環境では増殖を停止し、増殖に適した環境になるまで「耐え忍ぶ」機構を有している。一方で、従属栄養細菌が極貧栄養状態でも何とか「やりくり」して積極的に増殖する能力も、細菌の環境適応・生存戦略の一つとして存在すると考えられる。実際、我々は、好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株のトランスポゾン挿入突然変異株の解析の過程で、大気中の CO_2 を固定し有機炭素源非添加無機固体培地上で生育する能力 (oligotrophic 表現型)を有する株を取得し、本表現型には Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現が直接的要因となることを明示した。さらに、不均衡変異導入法（DNA 複製のエラーを校正する機能を欠如したポリメラーゼにより高い突然変異効率を誘発させる手法）を UT26 株および *adhX* 破壊株に適用したところ、前者のみで oligotrophic 表現型を示す突然変異株がリファンピシン耐性突然変異株より高頻度で出現することを見出した。本研究では、不均衡変異導入法によって得られた oligotrophic 突然変異株にどのような突然変異が起こったのか解析を進めた。
【方法・結果および考察】不均衡変異導入法で得られた oligotrophic 表現型突然変異株でも *adhX* が高発現していると予想されたため、当該突然変異株から任意に 3 株選抜し、*adhX* 遺伝子の発現量を野生型株と相対比較した。その結果、予想通り、いずれの株でも野生型株より有意に *adhX* 遺伝子が高発現しており、*adhX* 遺伝子高発現が起こりやすい突然変異であると考えられた。次に、これら突然変異株の *adhX* 遺伝子の上流のプロモーターを含むと思われる領域の塩基配列を解析したが、解析した領域内には突然変異は確認されなかった。すなわち、*adhX* 遺伝子高発現はシスエレメントの突然変異ではなく、当該領域に結合する発現抑制因子の突然変異による脱抑制である可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証するために、広宿主域プロモーター検索ベクターのレポーター遺伝子 *lacZ* 上流に当該領域を挿入したプラスミドを作製し、本プラスミドを保持する野生型株および *adhX* 遺伝子高発現突然変異株の LacZ 活性を測定した。その結果、3 株の突然変異株のうち 2 株において野生型株よりも有意に高い LacZ 活性が検出された。以上の結果は、(i) *adhX* 遺伝子上流域に結合する転写抑制因子が存在すること、(ii) 本転写抑制因子の突然変異による *adhX* 遺伝子高発現で引き起こされる oligotrophic 表現型は比較的起こりやすい突然変異であること、を強く示唆する。現在、推定転写抑制因子の同定を進めている。

sphingomonad, oligotroph, carbon fixation

講演番号：2A02a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A02 会場

ニキビ患者群に多いアクネ菌株に対して選択的抗菌活性を示す脂肪酸のスクリーニング
Screening of fatty acids showing selective antibacterial activity against acne-associated *Propionibacterium acnes*.

宇山 彩香[2]、杉野 哲造[2]、田中 重光[1]、○永尾 寿浩[1]（[1]大阪技術研、[2]桃谷順天館）
Ayaka Uyama[2], Teizo Sugino[2], Shigemitsu Tanaka[1], ○Toshihiro Nagao[1] ([1]Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology, [2]Momotani juntenkan Ltd.)

【背景・目的】*Propionibacterium acnes*（アクネ菌）は健常者の皮膚に広く分布する常在菌であり、通常は無害であるが、種々の皮膚疾患に関与する場合もある。青年期に多い尋常性ざ瘡（ニキビ）は顔面、胸背部の毛包・脂腺に見られる炎症性疾患であり、脂質代謝異常、角化異常、および *P. acnes* などの微生物が複雑に関与して発症する。近年、ニキビ患者群とコントロール群（健常者群）における *P. acnes* の株レベルでの系統解析が報告された。複数の分類法があるが、リボタイプ(RT)で分類した場合、RT1, RT2, RT3 型株はニキビ患者群と健常者群の双方に均一に分布していたが、RT4, RT5 型株はニキビ患者群に多く、RT6 型株は健常者群に多かった。RT4, RT5 型株は、ポルフィリンなどのニキビ関与因子を RT6 型株よりも多く発現し、末梢血単核細胞からの炎症性サイトカイン IFN-γ と IL-17 産生を他株よりも促進したのに対して、RT6 型株は、リパーゼ（皮脂を遊離脂肪酸に加水分解し、毛穴詰りの原因の 1 つとなる）遺伝子に欠損変異が導入され、同細胞からの抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を他株よりも促進したことが報告されている。従って、全ての *P. acnes* 株がニキビの原因ではなく、RT4, RT5 型株などの一部の *P. acnes* 株がニキビの発症に関与している可能性が示唆されている。そこで本研究では、ニキビ患者群に多い RT4, RT5 型株の生育を抑制し、健常者群に多い RT6 型株の生育を抑制しない物質のスクリーニングを行った。なお、*P. acnes* の属名と種名の再編が提案されており、今後、*P. acnes* の名称が変更されると思われる。
【方法・結果】*P. acnes* の RT1～RT6 型株は BEI リソース（米国）から、*P. acnes* 標準株は NBRC からそれぞれ入手した。抗菌活性は、微量液体希釈法により最少生育阻止濃度(MIC)で評価した。はじめに、イソプロピルメチルフェノールなどの複数の既存抗菌剤を試したところ、RT4, RT5 型株と、RT6 型株の MIC に有意差が認められなかった。次に、種々の飽和脂肪酸、パルミトレイン酸、オレイン酸等の MIC を評価したところ、一部の脂肪酸は RT4, RT5 型株の生育を抑制し、RT6 型株の生育を抑制しない選択的抗菌活性があった。これらの脂肪酸の中でも特に、自然界で希少なある 1 つの脂肪酸は両菌株間の MIC の差が最も大きかった。また、この脂肪酸は RT1～RT3 型株、*P. acnes* NBRC107605 株（RT1 型, 標準株）の生育を抑制しなかった。さらに、RT4, RT5 型株はニキビ治療用の既存抗生物質 5 種類に感受性が弱く、抗生物質耐性を有していた。以上の結果より、当該脂肪酸は、ニキビ患者群に多い *P. acnes* 株の生育を選択的に抑制する新規な素材として有用であることが示唆された。

acne, antibacterial activity, *Propionibacterium acnes*

発表責任者：永尾寿浩（nagao@omtri.or.jp）

講演番号：2A02a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A02 会場

アルカン/培地二相培養系における *Rhodococcus erythropolis* PR4 の細胞局在性と酸素消費について
Relationship between cell localization of *Rhodococcus erythropolis* PR4 and reduction of oxygen in alkane phase of alkane-medium two phase culture

○田淵 大樹[1]、瀧原 速仁[2]、岩淵 範之[1]、砂入 道夫[1] ([1]日本大学、[2]新潟大学)
○Daiki Tabuchi[1], Hayato Tskihara[2], Noriyuki Iwabuchi[1], Michio Sunairi[1] ([1]Nihon Univ., [2]Niigata Univ.)

【目的】

R. erythropolis PR4 株は、アルカンとの相互作用が極めて特徴的であることが明らかにされている。同菌は培地/アルカン二相培養系において、アルカンの炭素数によって、水/アルカンの界面に菌体が吸着する「吸着型」、あるいは水相に接種した細胞がアルカン相内に転移して生育する「転移型」というように、局在性を変化させる極めて特徴的な挙動を示す。例えば、同菌は *n*-ドデカン(C12)条件では吸着型、*n*-ヘキサデカン(C16)条件では転移型を示すことがそれぞれ確認されている。この際、PR4 株の生育は吸着型を示す条件では通常の培地条件よりも減退する。一方、転移型を示す条件では良好な生育を示し、培地条件と同等のコロニー数が形成される。後続の研究においては、無機塩培地と C12 の二相培養系において、$MgSO_4$を添加する量・時期を調節することにより、細胞の局在性および生育能を制御できることが示唆されている。$MgSO_4$添加時では、細胞は吸着型を示したが、無添加条件では転移型を示した。同条件でのコロニー数は $MgSO_4$添加条件よりも無添加条件で多く、これまでの実験と傾向が一致した。さらに、CTC 染色による呼吸活性の試験では、吸着型を示す細胞において高い呼吸活性が確認され、転移型ではほとんど呼吸活性が見られなかった。これらのことから、局在性と相中の酸素を取り込んで呼吸に用いる能力の関連が示唆された。われわれはこれまでに、*Rhodococcus* 属細菌の約 7 割がアルカン相に転移し、生育できる能力を有していることを示しているが、その中での酸素の取り込み等に関しては不明な部分が多い。それ故本研究では、非接触式の酸素濃度計を用いて、二相培養におけるアルカン相内の溶存酸素について検討を加えた。

【方法、結果と考察】

まず、*R. erythropolis* PR4 株を各種アルカン(C12 あるいは C16)＋IB2 培地で培養後、アルカン相を採取し、非接触式の酸素濃度計 Fibox3 (PreSens)を用いて、アルカン相内に残存する酸素量を測定した。アルカン相内の酸素量は空気中の飽和酸素濃度を 100%とした時の相対値で得られた。コントロールとして微生物無添加の系を用意し、比較検討した。その結果、同菌を添加したアルカン/培地系の C12 と C16 中の酸素濃度はそれぞれ 65.1%、4.0%まで低下していた。一方、菌を添加しないコントロールでは、96.6%、95.1%もの酸素が残存していた。本実験では、細胞の局在性に関わらず、いずれのアルカン添加条件においても、酸素濃度の低下が見られた。特に、転移を示す条件では、酸素濃度が大幅に低下したことから、転移型の細胞がアルカン相内で、酸素を利用していることが示唆された。

Rodococcus erythropolis PR4, oxygen, alkane

発表責任者：岩淵範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A02a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A02 会場

窒素およびリン欠乏下での *Nannochloropsis* 属微細藻類の油生産と抽出した油試料中の脂肪酸組成
Oil production by *Nannochloropsis* microalgae under nitrogen and phosphorus deficiency and fatty acid composition of extracted oil samples

○桑原 僚、滝口 泰之（千葉工大工）
○Ryo KUWAHARA, Yasuyuki TAKIUCHI (Chiba Tech.)

[背景・目的]

微細藻類は古くから餌料として主に水産業で利用されてきた．*Nannochloropsis* は藻類の中でも比較的成長が速く，生産する脂肪酸には EPA やパルミトレイン酸などの有用な脂肪酸が含まれており，医療品や健康食品などへの利用が期待される．また藻類は光合成することで CO_2 を固定し，その余剰分を脂質や糖質などとして貯蔵する性質を持ち，環境ストレスがかかると増殖を止めて油を合成する能力を持つ．本研究ではこの藻類の特徴を利用した培養条件の検討を行うとともに培養期間によってもたらされる脂肪酸組成の変化を測定した．

[方法]

BG-11 培地 1000 ml を加えたガラス製培養ビンに *Nannochloropsis oceanica* IMET1 を 680 nm の吸光度が 0.4 となるように接種し，30℃，明度 80 μmol・m^{-2}・s^{-1} で 2%CO_2 を通気して培養した．培養 10 日目に細胞を遠心分離で回収し，BG-11 培地と BG-11 培地から窒素源やリン源を除いた培地に移して同条件で培養を続けた．測定は培地移動の後 6 日毎に行った．油は Bligh-Dyer 法により抽出した．また，脂肪酸組成はケン化後に長鎖・短鎖脂肪酸解析キット(YMC 製)を使用して 2-NPH 誘導体化し，HPLC により分析した．カラムは YMC-Pack FA(250×6.0 mm)を使用した．脂肪酸組成の解析では *N. oceanica* IMET1 と *Nannochloropsis sp.* ((有)生物工学研，*Nannochloropsis* Green Water)を用いた．

[結果・考察]

BG-11 培地，窒素欠乏培地，リン欠乏培地，窒素・リン欠乏培地でそれぞれ培養したところ，油抽出量はそれぞれ 0.077 g/L，0.069 g/L，0.072 g/L，0.111 g/L となり，窒素・リン欠乏培地で最大となった．また BG-11 培地，窒素欠乏培地，リン欠乏培地では培養 18 日目で油抽出量が最大となったが，リン欠乏培地では 6 日目が最大であった．*Nannochloropsis sp.* から抽出した脂肪酸中には EPA が約 10%，パルミトレイン酸が約 28%含まれていた．*N. oceanica* IMET1 の脂肪酸組成は EPA が 0.2%未満で，パルミトレインは脂肪酸中の約 6%であった．また，培地移動後 24 日目の窒素・リン欠乏培地では EPA が約 1%確認され，パルミトレイン酸の蓄積は BG-11 培地の培地移動後 0 日目と，培養 24 日目の窒素・リン欠乏培地で増加する傾向がみられた．脂肪酸組成の培養温度や明暗条件にともなう変化については現在検討中である．

microalgae, fatty acid composition, lipid production

講演番号：2A02a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A02 会場

葉面 C1 微生物 *Methylobacterium* sp. OR01 株が葉面で利用可能なパントテン酸合成前駆体化合物の同定

Identification of precursor compounds in the pantothenate biosynthesis pathway that are available by Methylobacterium sp. strain OR01 in the phyllosphere

吉田 裕介[1]、○由里本 博也[1]、井口 博之[2]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]京都学園大バイオ環境)
Yusuke Yoshida[1], ○Hiroya Yurimoto[1], Hiroyuki Iguchi[2], Yasuyoshi Sakai[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyotogakuen Univ.)

【緒言】メタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育でき、pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) とも呼ばれる *Methylobacterium* 属細菌は、植物の葉上微生物の優占種であり、植物に対して生長促進効果を発揮する菌株も報告されている。この菌の生長促進や共生のメカニズムは不明であり、これらの解明は新しい農作物増産技術の開発および自然界における植物－微生物相互作用のさらなる理解につながると期待される。我々はこれまでに、当研究室で植物試料より単離した複数の PPFM についてビタミン B 類の要求性を調べた結果、約 3 割の株がパントテン酸（ビタミン B_5）を必要すること、パントテン酸生合成前駆体である β-アラニンの添加によっても最少培地生育が回復することを明らかにした [1)]。本研究では、赤シソ種子より単離され、赤シソ葉上に優占化する *Methylobacterium* sp. OR01 株 [2)]をパントテン酸要求性株のモデルとして用い、β-アラニンの前駆体のうち最少培地中での生育を回復する化合物を探索した。さらに各前駆体が植物葉上に存在するかどうかについて調べた。

【実験方法および結果】*Methylobacterium* sp.OR01 株のドラフトゲノム配列解析により、OR01 株は少なくとも 4 つの β-アラニン生合成経路を持つことが推定された。そこで、これらの β-アラニン合成経路における前駆体化合物を最少培地に添加し、OR01 株が生育可能かどうかを調べたところ、5,6-dihydrouracil、*N*-carbamoyl-β-alanine、spermine、spermidine および 3-hydroxypropanoate が OR01 株の最少培地での生育を回復させた。続いて、これらの前駆体の植物葉上に存在するかどうかを調べた。無菌的に 14 日間栽培したシロイヌナズナの葉を滅菌水に浸して 15 分間回転混和した後、上清を回収し、上清中の各前駆体量を LC-MS/MS を用いて測定した結果、*N*-carbamoyl-β-alanine、spermidine、3-hydroxypropanoate が検出された。一方、spermine と 5,6-dihydrouracil については検出できなかった。これまでに葉上での存在を確認していたパントテン酸および β-アラニンに加え、β-アラニンの前駆体である *N*-carbamoyl-β-alanine、spermidine、3-hydroxypropanoate も葉上に存在したことから、OR01 株はこれらの化合物を葉上で摂取して生存していると考えられる。

1) 吉田ら、日本農芸化学会 2017 年度大会、4c19a05
2) Mizuno M *et al*., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1533-1538 (2013).

Methylobacterium, pantothenate, phyllosphere

講演番号：2A02a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A02 会場

Rhodococcus erythropolis N9T-4 株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
Functional analysis of putative transporter genes involved in oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○松岡 友洋、吉田 信行（静大院・総合科技）
○Tomohiro MATSUOKA, Nobuyuki YOSHIDA (Shizuoka Univ.)

【緒言】鹿児島県志布志市にある備蓄原油中から単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株(以下，N9T-4)は，炭素源，窒素源，および硫黄源無添加の無機塩固体培地（BM 培地）上でも良好な生育を示す超低栄養性細菌である．本菌は生育に大気中の CO_2 を要求し，その際に光などの特別なエネルギーの添加を必要としないという非常にユニークな性質を持っている．窒素代謝については，大気中に存在する微量アンモニアを利用していることを予想しているが，CO_2 固定経路およびエネルギー獲得機構については有効な手がかりが見つかっておらず，未だ詳細の解明には至っていない．培地成分や光をエネルギーとしないことは明らかであるため，我々は，本菌は低栄養条件下において，培養環境中に微量に存在している化合物からエネルギーを獲得していると予想している．本研究では，低栄養生育に必須となる化合物の取り込みが行われているかを明らかにすることを目的とし，本菌のゲノム上に存在する機能未知の推定トランスポーター遺伝子の機能解析を行った．
【方法と結果】本菌の DNA マイクロアレイ解析によって，低栄養条件（BM 培地），富栄養条件（LB 培地）の遺伝子発現の差を調べると，3 つの推定 ABC トランスポーター(ATP-binding cassette transporter)遺伝子が低栄養条件で特異的に高発現していることを見いだした．そこで，これらの遺伝子をゲノム上から欠失させた遺伝子欠損株を作製し，低栄養条件下での生育について親株との比較を試みることにした．ABC トランスポーターは，ATP 結合ドメイン，膜貫通ドメインから成り，物質の輸送には基質結合タンパク質（SBP）が必須となる．本研究の目的においては，SBP の解析が最も重要であると考えられる．そこで，欠失させたい 3 つの SBP（SBP1，SBP2，SBP3）をコードする遺伝子の上流，下流それぞれ 500 bp を結合させた DNA 断片を pK19sacB プラスミドに挿入することで遺伝子欠損用プラスミドを構築した．この遺伝子欠損用プラスミドをエレクトロポーション法により N9T-4 株に導入した．相同組換えにより得られたカナマイシン耐性株を，LB 培地で液体培養した後，スクロースを含む LB 培地で培養することにより，シームレスな SBP 遺伝子欠損株の作製を行った．その結果，3 つの独立した遺伝子欠損株とそれぞれの多重欠損株の作製に成功した．BM 培地を用いて，それぞれの遺伝子欠損株の生育試験を行い，親株との間に生育の違いが見られるか観察した．その結果，1 つの遺伝子欠損株（Δ*sbp1*）で，親株と比較して顕著な生育の低下が認められたことから，SBP1 は本菌の低栄養条件下での生育に重要な遺伝子であることが示唆された．現在，様々な培養条件で生育試験を行い，生育に差異が見られた要因の特定を試みている．

Rhodococcus, oligotroph, transporter

講演番号：2A02a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A02 会場

緑膿菌の *cbb*$_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素の機能解析
Function of the *cbb*$_3$ cytochrome *c* oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*
○木戸 玲子、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Reiko KIDO, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【目的】緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は土壌、海水、淡水、動植物体内などに幅広く生息しているグラム陰性細菌であり、日和見感染を引き起こす病原菌として知られている。緑膿菌は好気呼吸を行う際に利用する末端酸化酵素など、エネルギー代謝関連の酵素を複数種持っており、生育環境に応じて最も適した性質をもつ酵素を使い分けることで環境に適応していると考えられている。

本菌は 4 種類の末端酸化酵素（*bo*$_3$、CIO、*caa*$_3$、*cbb*$_3$）を持ち、*cbb*$_3$ 型酸化酵素は 4 タイプ（N1 型アイソフォーム～N4 型アイソフォーム）に分類される。このうち、N3 型アイソフォームと N4 型アイソフォームはそれぞれ低酸素環境において亜硝酸イオン、シアン化物イオンによって発現が誘導され、それらの物質に対する耐性をもつことがわかっている。しかしながら、これらの酵素の機能や他の末端酸化酵素との使い分け等、明らかになっていない部分は多い。

そこで本研究では、緑膿菌における DNA バーコードという手法を確立し、それを用いて *cbb*$_3$ 型酸化酵素の機能をより詳細に解析し、知見を拡充することを目的とした。DNA バーコードとは、特定の塩基配列をもった断片を作製し、緑膿菌の各種破壊株のゲノムに組み込んでその塩基配列をバーコード（目印）とし、qPCR や次世代シークエンサーなどを用いて各株を共培養したときにどの株が優占化するかを調べることができるシステムである。

【方法・結果】好気条件、微好気条件における末端酸化酵素のシアン耐性能を明らかにするため、好気条件下でのシアン耐性を持つ末端酸化酵素である CIO の遺伝子群 *cio* の欠損株（Δ*cio*）と N4 型アイソフォームの主要サブユニット遺伝子 *ccoN4* の欠損株（Δ*ccoN4*）、また *cio* と *ccoN4* の二重欠損株（Δ*cio*Δ*ccoN4*）の DNA バーコードラベル株を用いてそれぞれ野生株と共培養を行った。

シアン非添加時においては、好気・微好気のどちらの条件下でもΔ*cio*、Δ*ccoN4*、Δ*cio*Δ*ccoN4* それぞれと野生株との存在割合はほとんど変化しなかった。シアン添加時においてはそれぞれの欠損株を単独で培養した際には見られなかった挙動が確認できた。緑膿菌は酸素濃度によってシアン耐性に寄与する主要な末端酸化酵素をうまく使い分けていると考えられる。
N3 型アイソフォームについても好気条件・微好気条件における共培養を行い、機能の解析を進めている。

Pseudomonas aeruginosa, aerobic respiration, terminal oxidase

講演番号：2A02p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A02 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 が産生する硫黄粒子について
Sulfur globules produced by a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○小倉 一将、亀谷 将史、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科）
○Kazumasa OGURA, Masafumi KAMEYA, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (The Univ. of Tokyo)

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 は伊豆の峰温泉付近の土壌から単離された好熱性絶対独立栄養性の水素細菌である。本菌はエネルギー源として水素またはチオ硫酸、唯一の炭素源として二酸化炭素を利用する。当研究室では遺伝子破壊株の表現型解析、マイクロアレイ解析などにより、本菌における硫黄代謝の研究が行われてきた。

本菌におけるチオ硫酸酸化は 2 つのステップに分けられる。チオ硫酸はペリプラズム中の Sox タンパク質によって酸化される。本菌の生育においては、この際に生成された硫黄種の一部が硫黄粒子として菌体外に蓄積される。また本菌は放出した硫黄粒子を取り込み、さらに酸化することで生育するためのエネルギーを得るほか、一部の硫黄原子を同化して生体構成成分とすることができる。

菌体外に硫黄粒子を産生する細菌は他にも例があるが、硫黄粒子に関する知見は未だ少ないのが現状である。そこで本研究では、本菌が産生する硫黄粒子に着目し、その性質を明らかにすることを目的とした。

本菌をチオ硫酸存在下で培養し、培地中の元素硫黄濃度を経時的に測定した。野生株では、好気条件において最大 0.6 mM の硫黄の蓄積が見られた。また硫黄酸化酵素の破壊によって培地中の硫黄量が増加した。

チオ硫酸存在下で培養した菌液を、スクロース溶液中を通すことで菌体画分と硫黄粒子画分に分離し、種々の解析を行った。ゼータサイザーを用いて、分離した硫黄粒子の粒子径を測定した。また硫黄粒子中に含まれるタンパク質の探索を行った。その結果、菌体画分中には見られない、硫黄粒子画分特有のタンパク質が確認された。このタンパク質は既知の硫黄粒子結合タンパク質とは相同性のない、新規なタンパク質であった。本発表では以上の知見に加え、同定したタンパク質の特徴についても報告する。

extremophile, sulfur metabolism, sulfur globule

講演番号：2A02p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A02 会場

絶対独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 におけるアミノ酸取り込み
Amino acid uptake in an obligately autotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○小林 あずさ、金 克泰、亀谷 将史、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科）
○Azusa KOBAYASHI, Keug Tae KIM, Masafumi KAMEYA, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】好熱性絶対独立栄養性の水素細菌である *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は、エネルギー源として水素を、唯一の炭素源として二酸化炭素を利用する。近年、本菌において新規 Phosphoserine phosphatase が発見された。この酵素は、本菌における Ser 生合成を担う酵素であり、この酵素をコードする遺伝子 *pspA* を破壊した株（*ΔpspA*）は、Ser 要求性を示すことがわかった。しかし、独立栄養性である本菌においてアミノ酸取り込み機構はこれまで見つかっておらず、また大腸菌の Ser 輸送体遺伝子のホモログも本菌ゲノムには存在しないことから、本菌がどのようにして Ser を取り込むのかに興味が持たれた。本菌ゲノムを精査したところ、LIV system というアミノ酸輸送体のホモログが見つかった。本システムは、大腸菌において主に分岐鎖アミノ酸 Leu、Ile、Val を輸送することが報告されているが、絶対独立栄養性生物における機能が報告された例はない。そこで、独立栄養性細菌である本菌が LIV system を通して Ser を輸送するかを明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】*H. thermophilus* の培養は、野生株では独立栄養培地またはそこへ Ser を添加した培地で、*Δ pspA* では独立栄養培地に Ser を添加した培地で行った。野生株と *ΔpspA* の、LIV system の遺伝子発現レベルを比較するために、qRT-PCR 転写活性測定を行なった。*Δ pspA* における LIV system による Ser 取り込みの競合阻害を観察するために、アミノ酸の種類や濃度を変化させて培地に添加し、経時的に生育測定を行った。
【結果・考察】*ΔpspA* における LIV system の遺伝子発現レベルは野生株のそれと同等であったことから、本菌において LIV system の発現は *pspA* 破壊や Ser 添加の影響を受けず、構成的に発現していると考えられた。*ΔpspA* に Leu、Ile、Val を 1 種類ずつ添加したところ、Ser 依存的な生育に阻害が見られ、また、添加濃度が高いほど *Δ pspA* の生育が強く阻害された。同様の生育阻害は Leu、Ile、Val の 3 種類を同時に添加した場合にも見られ、分岐鎖アミノ酸生合成系のフィードバック阻害によるものではないことも裏付けられた。これらの結果から、本菌が LIV system を通して Ser を取り込むという仮説が強く支持された。

Hydrogenobacter thermophilus TK-6, Obligately autotrophic bacterium, LIV system

講演番号：2A02p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A02 会場

L 型大腸菌が栄養型に復帰するときの形態変化に関する基礎的研究

Morphological regeneration in L-form of *Escherichia coli*.

○藤田 智也（茨城県立医療大医セ）
○Tomoya FUJITA (Ibaraki Pref. Univ.)

薬剤ストレスや遺伝子の発現制御などによって誘導される細胞壁を持たない L 型菌は、通常の栄養型と比較して形態や分裂様式が異質であり、様々な感染症の患者から単離されていることから、細菌の感染性や病原性に関与しているのではないかと強く疑われている。また、細胞壁がない原始細胞においては、細胞融合などによって頻繁に遺伝情報の水平伝播が生じていたと考えられているため、近年では、マイコプラズマや L 型菌のような細胞壁が欠損した細菌を対象にした生物進化学的な意味合いを強く意識した研究も盛んに行われている。

演者は、薬剤処理して誘導した L 型大腸菌が、細胞の一部が陥入したもの、アメーバ状、マイコプラズマの分裂様式に類似した伸長型、3 極以上に伸長した分枝型など、ユニークな細胞形態を経ながら最終的には同じ栄養型形態に復帰する現象を確認し、この過程における形態形成や細胞分裂に係る幾つかの主要な因子の分子挙動について経時観察を行った。この結果から、薬剤ストレスによって誘導された細菌の特殊形態がたどる新奇な復帰現象に関する形態学的知見が得られたので報告する。

L-form, stress response, cytoskeleton

発表責任者：藤田　智也（fujitat@ipu.ac.jp）

講演番号：2A02p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A02 会場

大腸菌の熱耐性と加熱損傷菌発生における発育・回復培地および抗酸化系化合物の影響
Effects of growth and recovery media and antioxidants on the heat resistance and injury of Escherichia coli

○和田 彰啓[1]、小池 佳都子[2]、冨井 恵奈美[2]、坂元 仁[2,3]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2,3]（[1]大阪府大院工、[2]大阪府大 21 科研、[3]大阪府大放研セ）
○Akihiro Wada[1], Katsuko Koike[2], Enami Tomii[2], Jin Sakamoto[2,3], Tetsuaki Tsuchudo[2], Masakazu Furuta[1,2,3] ([1]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]21Res. Osaka Pref. Univ., [3]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ.)

〔目的〕 加熱は食品や医療分野での殺菌に多用され、細菌の熱死滅の評価には平板法が汎用される。一般に殺菌工程では損傷菌が発生し、その動態によって生残菌数が変動することが多い。演者らは平板法と発育遅延解析（GD）法[1)]および最確数（MPN）法との間での生残菌数との差に基づく差分後培養による損傷菌計数法[2)]を提案しており、加熱損傷菌の発生挙動を解析している[3)]。細菌細胞の熱死滅は発育や殺菌処理後の回復時の条件によって影響を受けるが、これには損傷菌の挙動が深く関わっている[4)]。そこで本研究では加熱処理した大腸菌細胞を対象に、合成培地と天然培地を用いてその熱耐性・損傷への発育時と処理後の回復時の培地の影響および、回復培地にピルビン酸ナトリウム（NaP）とチオ硫酸ナトリウム（NaTS）を添加した影響を検討した結果を報告する。
〔方法〕 大腸菌 NBRC106482 (OW6)株を供試菌とし、0.1%カザミノ酸を含む最少培地の M9（EM9）および LB 培地を、加熱前の 30℃での発育〔継代および前培養・本培養（対数増殖期まで）〕と加熱後の同温度での回復の培養に用いた。回復は平板法で CFU を求め、GD 法ではマイクロプレートリーダー中での液体培養に、MPN 法では液体静置培養による濁度測定を行い、加熱処理はリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）中 50℃で行った。NaP（0.1%）と NaTS（1%）は回復培地に添加した。
〔結果〕 大腸菌の加熱後の生残率は、発育・回復両過程を EM9 としたときの方が共に LB としたときよりも高くなった。発育過程が EM9 のとき、回復過程を LB に変えると、熱耐性は共に LB の場合と同程度に低下した。回復時の NaP の平板添加効果は発育時が EM9 で、回復時も EM9 では効果はないが、LB では著大であった。同じく EM9 発育後の回復時の NaTS 添加は EM9、LB とも顕著な効果を示した。発育・回復ともに LB のときは、両抗酸化剤ともやや生残率を向上させた。これらの結果から、低栄養発育は高栄養発育よりも大腸菌の熱耐性を上昇させること、回復時の抗酸化剤添加は天然培地での熱耐性を向上させ、発育時低栄養ではその効果が大きくなることが明らかになり、回復時の 2 次損傷がさらに強く軽減されるものと推察した。差分後培養法による損傷菌測定結果についても報告するとともに、損傷菌発生の要因についても考察する。

1)Takano, M. & Tsuchido, T., J. Ferment. Technol., 60, 189 (1982). 2)Tsuchido, T.: Biocontrol Sci., 22, 131 (2017). 3)岩田ら, 生物工大会要旨集, p.317 (2016). 4)岩田ら,防菌防黴大会要旨集, p.214 (2015).

heat resistance, injured bacterium, antioxidant

講演番号：2A02p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A02 会場

枯草菌胞子の発芽レセプター活性測定システムを用いた全アミノ酸の発芽誘発特性の評価

Characterization of germinant activity of amino acids using the germination receptor assay system in *Bacillus subtilis* spore

○坂元 仁[1,2]、古田 雅一[1,2,3]、土戸 哲明[1] ([1]大阪府大 21 科研、[2]大阪府大放研セ、[3]大阪府大院工)
○Jin Sakamoto[1,2], Masakazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]21Res. Osaka Pref. Univ., [2]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

〔背景〕細菌胞子は飢餓条件下で形成を開始し、高温、電磁波、化学薬剤処理に対して高い耐性を示す休眠細胞であり、その不活性化は製造業において常に重要な問題である。耐性化の要因は胞子形成期におけるジピコリン酸のコア内への蓄積や、コルテックスによるコアの締め付けによる脱水状態が寄与していると考えられている。この胞子に何らかの栄養源が発芽トリガーとして発芽レセプターに接触すると発芽を開始し、発芽後生長を経て栄養細胞として増殖する。枯草菌や一部の嫌気性細菌で芽胞の発芽システムが研究されているが、詳細は不明な点も多い。枯草菌では L-アラニンによる発芽に関与するとされる GerA 系と、AGFK（L-アスパラギン、グルコース、フルクトース、KCl）による発芽に関与するとされる GerB 系と GerK 系が報告されている。発芽の最終段階では胞子特有の細胞壁であるコルテックスを 2 種類の主要コルテックス分解酵素 CwlJ と SleB の作用により分解して栄養細胞への分化を導く。この発芽レセプターからコルテックス分解酵素の活性化の経路の詳細は不明であるが、コア外へ漏洩されるジピコリン酸による CwlJ の活性化モデルが Setlow らにより提唱されている。
〔目的〕我々はコルテックス分解酵素ホモログ全欠損胞子の発芽過程の解析から、コルテックス分解酵素非依存性の胞子の光学密度低下（coltex lytic enzymes-independent reduction of optical density in spore、略称 CLEIRODS）を発見し、さらにこの光学密度の低下が発芽レセプターの欠損により抑制されることを見出した。このシステムはこれまで不可能であった発芽レセプター単独の機能評価に有効なツールであると考えられた。これまでの枯草菌胞子の発芽研究ではコルテックス分解による光学密度の低下という下流カスケードの反応のノイズがあまりに大きかったために発芽初期の光学密度低下現象を検出できなかったと考えられる。特にこれまでの枯草菌発芽トリガーの研究は、発芽現象全体の解析であって発芽レセプターの特性を評価できるものではなかったといえる。そこで我々は本システムを用いて発芽トリガーとして 20 種の全アミノ酸に対する各発芽レセプターの応答についての網羅的評価を試みた。
〔方法と結果〕我々はコルテックス分解酵素ホモログ *cwlJ sleB ydhD yaaH* の 4 重欠損株に対して発芽レセプター遺伝子 *gerAA gerAB gerAC*、*gerBA gerBB gerBC*、*gerKA gerKC gerKB* の 3 オペロンの単独セット、二重セット、三重セット欠損株の胞子を Schaeffer 胞子形成培地で調製後、全自動光学密度測定装置を用いて初期発芽の濁度低下（OD_{650}）を測定した。各発芽レセプターがどのアミノ酸に対して反応性が高いかについての調査結果を報告する。

Bacillus subtilis, spore, germination receptor

発表責任者：坂元仁（sakamoto.jj@gmail.com）

講演番号：2A02p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A02 会場

プラスミド保持に伴う負荷を細菌はどう軽減化するのか？
How does *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 reduce the plasmid fitness cost?
○河野 響、上田 朋美、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Hibiki KAWANO, Tomomi UEDA, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景】プラスミドは可動性遺伝因子の一つであり、宿主に薬剤耐性などの新規形質を付与する一方、宿主の生育に負荷となることも実験的に多く報告されている。プラスミド保持株が集団から淘汰される現象はプラスミド保持に伴う負荷に起因する。昨年度までに、*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株は、非選択条件下で pCAR1 (IncP-7, 200 kb) をはじめとする不和合性群やサイズの異なる 8 種のプラスミドを各々保持した際にも負荷が認められないことを報告した。今年度は、CA10dm4 株が有するそのようなプラスミド保持に伴う負荷回避機構の解明を目指し、CA10dm4 株および 3 種のプラスミド保持株 (pCAR1, RP4, NAH7K2) を RNA-Seq に供し、プラスミドの保持が CA10dm4 株染色体遺伝子の発現に与える影響を評価した。またトランスポゾンによる破壊株を用いたスクリーニングにより、pCAR1 保持に伴う負荷が認められるような変異株の取得を行った。
【方法・結果】スクリーニングには、トランスポゾン Tn*5* により GFP カセットがランダムに挿入された pCAR1 保持株の破壊株ライブラリーを供した。負荷の評価にはプラスミド保持株と非保持株を等量混合したものを 24 時間ごとに植え継ぎ、経時的にプラスミド保持株の比率を算出する competition assay を用いた。1 段階目のスクリーニングは 1 ml のスケールで行い、GFP 強度を OD_{600} で除した値の経時的変化から負荷を評価した。値が大きく減少したものに関しては「負荷が認められた」として、続いて 100 ml のスケールの competition assay に供し、コロニー数から比率を算出した上で、「各時間におけるプラスミド保持株の比率を培養開始時のプラスミド保持株の比率で除した値」(competitive index) で負荷を評価した。加えて生育速度および pCAR1 保持の安定性も確認した。その結果、pCAR1 保持に伴う負荷が認められる変異株が現時点で 4 株取得された。しかし、株によって生育速度や pCAR1 保持の安定性といった表現型は異なっていた。例として pCAR1 非保持株との生育遅延は確認されず、pCAR1 を安定に保持できる変異株の結果を図に示す。現在、トランスポゾンの挿入位置を確認しており、本大会では特定された因子に関して RNA-Seq のデータと併せた議論を行う。

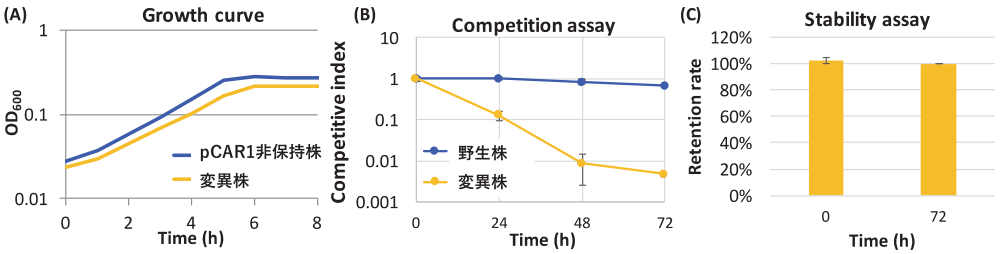


図. 取得された変異株の表現型
(A) pCAR1 非保持株と変異株のでは生育速度の大きな差は見られない。
(B) 野生株ではプラスミド保持株が淘汰されない一方、変異株は大きく淘汰された。
(C) 変異株は competition assay の培養過程で安定に pCAR1 を保持した。

Plasmid, *Pseudomonas*, Fitness cost

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A02p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A02 会場

Pseudomonas resinovorans CA10dm4 株は汎用ベクターにも非感受性なのか？

Does *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 show the "insensitivity" to various vectors?

○上田 朋美、河野 響、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Tomomi UEDA, Hibiki KAWANO, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景】細菌細胞がプラスミドを獲得すると新規形質を発揮できる一方で、非選択条件下ではプラスミドの保持が生育負荷になることも良く知られている。しかし、当研究室において *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株は分解能や薬剤耐性能等のプラスミドの特性や不和合性群に関わらず、非選択条件下でプラスミド保持に伴う負荷が認められない株であることを示してきた。微生物を用いた物質生産はベクターの脱落を防ぐために抗生物質を添加するなど一般的に選択圧をかけて行われるが、CA10dm4 株の性質を考慮すると、この株を用いる場合は抗生物質添加を必要としない可能性が高い。これまでに CA10dm4 株における負荷の定量に用いられたプラスミドは、いずれも環境中から単離された状態のものであったため、本研究ではそれらとは大きさやコピー数が異なり、外来遺伝子の発現用にデザインされた汎用人工ベクターを用いて安定性や負荷の大きさの評価を行い、CA10dm4 の汎用宿主としての可能性を検討した。

【方法・結果】これまでに CA10dm4 株における負荷の定量に用いたプラスミドとは異なる複製起点を持つ 2 種の汎用広宿主域ベクターpBBR1MCS-5 および pSEVA251 を CA10dm4 株および *P. putida* KT2440 株に保持させた際の、宿主内でのベクターの安定性および宿主に与える生育負荷を評価した。まず、抗生物質を含まない非選択条件下でベクター保持株を培養し経時的にベクター保持株の比率を算出する stability assay を行う事で、ベクターの細胞内での安定性を評価した。その結果、いずれのベクターも非選択条件下で両宿主内で安定に保持された (図)。次にベクター保持株と非保持株を等量混合し、非選択条件下で継代培養しながら経時的に両者の比率を測定する competition assay によってベクターの保持に伴う負荷を評価した。その結果、培養開始時に 50%程度存在したベクター保持株の比率が KT2440 株を宿主とした場合にはいずれのベクターでも大きく低下したのに対し、CA10dm4 株ではほぼ一定に保たれた (図)。これらの結果は、CA10dm4 株は非選択条件下で各ベクターを安定に保持でき、かつベクターを保持しても生き残りやすさが減じないことを示している。発表では、CA10dm4 株の可能性について、外来遺伝子の発現の影響やベクターのコピー数と併せて議論する。

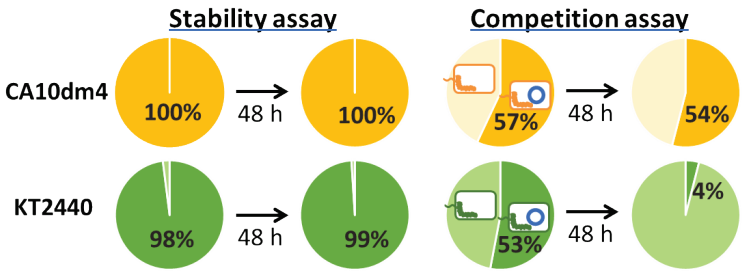


図. pBBR1MCS-5 を用いた際のベクター保持株比率

Plasmid, *Pseudomonas*, Fitness cost

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A02p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A02 会場

細菌の増殖における核様体タンパク質の役割

The role of nucleoid-associated proteins for growth of Escherichia coli.

○田島 玖美子[1]、山内 えりか[2]、石浜 明[3]、山本 兼由[1,2,3] ([1]法政大,生命、[2]法政大院,理工,生命、[3]マイクロナノテクセンター)
○Kumiko TAJIMA[1], Erika YAMAUCHI[2], Akira ISHIHAMA[3], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2,3] ([1]Dept. of Front. Biosci. Univ. of Hosei, [2]Dept. of Front. Biosci. Grad. Sch. of Sci. & Eng. Univ. of Hosei, [3]Res. Cen. for Micro-nano Tech. Univ. of Hosei)

細菌の増殖は、分裂の準備をする遅延期、その後著しく増殖する対数増殖期、そして見かけ上増殖しない定常期の連続する 3 つの特徴的な時期に分けることができる。本研究では、大腸菌の核様体タンパク質の増殖における役割を明らかとすることを目的とした。

まず、大腸菌の明確な遅延期を確認するため、固体培地上での増殖を顕微鏡下で観察した。その結果、定常期 1 細胞サイズが 20%増加したのち、2 細胞程度まで細胞の長軸が伸長し、その後 2 細胞に分裂した。この 2 細胞塊のそれぞれは 2 細胞程度の長軸まで細胞が伸長･分裂し、4 細胞塊を形成し増殖することを確認した。一方、対数増殖期について液体培地における濁度により測定した。15 分ごとの比増殖速度を算出し、増殖度と相関を調べた結果、比増殖速度は細胞密度が高くなるにしたがい一定の減速度を示し、さらに対数増殖期初期とそれ以降の減速度をもつことが明らかとなった。

大腸菌の 6 種類の核様体タンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ欠失した株について、固体培地上での遅延期および増殖初期について調べた。その結果、野生型と比較して遅延期が長い 3 種類の欠失株、1 細胞から 2 細胞までの時間が長い 2 種類の欠失株、2 細胞以降の時間が長い 1 種類の欠失株を確認した。つぎに、核様体のそれぞれを欠失した株の液体培地中の対数増殖期における減速度を測定した。その結果、少なくとも 2 種類の核様体遺伝子欠失株は、野生株で対数増殖期初期の減速度を明確に示さなかった。これらの結果をふまえ、大腸菌増殖における核様体タンパク質の役割を議論する。

Escherichia coli, nucleoid-associated proteins, growth

講演番号：2A02p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A02 会場

大腸菌細胞内に安定的に存在するレスポンスレギュレーターの増殖への寄与
Contribution of constitutive response regulators to growth of *Escherichia coli*

○三宅 裕可里[1]、石浜 明[2]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大院理工・生命、[2]マイクロナノテクセンター)
○Yukari MIYAKE[1], Akira ISHIHAMA[2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Dept. of Front. Biosci. Grad. Sch. of Sci. & Eng. Univ. of Hosei, [2]Res. Cen. for Micro-nano Tech., Univ. of Hosei)

細菌の主要な情報伝達システムである二成分制御系は、センサーキナーゼ（SK）による細胞外刺激の感知と自己リン酸化、SK からレスポンスレギュレーター（RR）へのリン酸基転移による RR の活性化、そして活性化 RR による特定遺伝子の発現調節の三段階の特異的反応により構成される。これら各段階の反応では交差した情報伝達（クロストーク）が報告されており、細菌多様性を担うネットワークが形成されているものと考えられる。大腸菌ゲノム上に推定される約 30 組の SK と RR は代謝やストレス応答等、環境変化に応じて種々の細胞内機能を制御している。このうち、PhoP, PhoB, CitB, OmpR の 4 種類の RR は大腸菌の増殖相を通して細胞内で比較的多コピー存在する。これらの RR は活性化すると、ゲノム上の多数の遺伝子発現を制御するグローバルレギュレーターとして知られ、さらに自身の遺伝子発現を促進するポジティブフィードバック調節を行う。本研究ではこれらの主要な構成的機能性 RR に着目し、増殖初期の大腸菌細胞における二成分制御系の役割を明らかにすることを目指した。

まず、ゲノム上の *phoP*、*phoB*、*citB*、*ompR* の遺伝的機能を欠失した大腸菌株の単離を行うため、CRISPR-Cas システムを用いたゲノム編集法を確立した。設計した大腸菌ゲノム編集法に則り、各遺伝子に対して特異的なガイド RNA を設計し、これを組み込んだガイド RNA 発現プラスミドを構築した。構築したガイド RNA 発現プラスミドと Cas9 およびλ-Red リコンビナーゼ発現プラスミドを細胞内に導入してゲノム DNA を切断した後、終止コドンを含む DNA 断片を用いた組換え反応により、ゲノム切断標的部位への終止コドン挿入を行った。結果として、*phoP*、*phoB*、*citB*、*ompR* 各遺伝子の単一機能欠失株および多重機能欠失株を獲得した。

増殖初期の大腸菌細胞の解析には顕微鏡を用い、寒天培地上の大腸菌を一細胞レベルで経時的に観察した。M9 グルコース液体培地で培養した野生型大腸菌 W3110 type A を M9 グルコースもしくは炭素源の異なる M9 寒天培地上に塗布して観察を行った結果、異なる炭素源を含む寒天培地上では遅延期の延長が見られ、また分裂を行わない細胞の割合も高かった。一方、遺伝子機能欠失株を用いて同様の実験を行ったところ、遅延期の長さや分裂を行わない細胞の割合が野生株と異なる傾向を示していた。これらの結果より、大腸菌の増殖初期細胞内多コピーレスポンスレギュレーターが野生株での正常な増殖の維持に関与することが示唆される。

Escherichia coli, two-component regulatory system, global regulator

発表責任者：山本兼由（kanyamam@hosei.ac.jp）

講演番号：2A02p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A02 会場

枯草菌における(p)ppGpp に依存しないアミノ酸飢餓適応機構の解析
Analysis of mechanism for adaptation to amino acid starvation independent of (p)ppGpp in Bacillus subtilis
○大坂 夏木[1]、高田 啓[2]、多喜乃 雄太[1]、兼崎 友[3]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1]、朝井 計[1] ([1]東京農大・院・バイオ、[2]立教大学・理・生命理、[3]東京農大・ゲノム解析セ)
○ NATSUKI OSAKA[1], TAKADA HIRAKU[2], YUTA TAKINO[1], YU KANESAKI[3], SATORU WATANABE[1], TAKU CHIBAZAKURA[1], HIROHUMI YOSHIKAWA[1], KEI ASAI[1] ([1]Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric, [2]Dept. Lifesci, Rikkyo Univ., [3]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric)

【背景・目的】GTP は細胞内の多くの反応に利用されている重要なヌクレオチドであり、環境変化に応じて、細胞内における GTP レベルの恒常性を保つことは生命活動の維持には必須である。細菌において、アミノ酸飢餓時に GTP レベルを制御する主要な機構として、核酸小分子(p)ppGpp による制御が存在する。枯草菌ではアミノ酸飢餓時に蓄積した(p)ppGpp が、GTP 生合成経路の下流を直接阻害し、GTP/ATP 量比を低下させる。この時、多くの遺伝子の転写開始効率が転写開始点のヌクレオチドの細胞内濃度に依存しており、転写開始点に GTP を利用する rRNA オペロン等の転写が抑制される一方、ATP を利用するアミノ酸生合成関連遺伝子等の転写が促進される。枯草菌(p)ppGpp 合成酵素遺伝子を全て欠失させた株（$ppGpp^0$ 株）はアミノ酸飢餓条件である最少培地では GTP レベルを制御できず、種々のアミノ酸不足等が起こり、生育阻害を示す。我々はその生育阻害を抑圧する変異を、(p)ppGpp によって制御される GTP 生合成経路の上流に位置するプリンヌクレオチド生合成経路の初発酵素遺伝子 *prs* にを見出した。これまで細胞内 GTP レベルは栄養状態に応じた(p)ppGpp を介した機構によるものとされてきた。Prs の機能の代謝経路上の位置を考慮すると、抑圧変異 *prs* による影響は、既知の(p)ppGpp による GTP/ATP 量比の制御では想定できず、この影響の解明により、栄養状態に応じたアミノ酸飢餓への適応に関与する新たな機構を見出せることが期待された。そこで本研究では抑圧変異 *prs* によってどのようにアミノ酸飢餓への適応性が回復しているのか解析を行った。
【結果・考察】抑圧変異株(*prs*)における Prs の細胞内タンパク量を確認したところ、野生株と同等であり、この変異が Prs の機能に影響するものであることが示唆された。次に、抑圧変異株(*prs*)におけるアミノ酸飢餓誘導時の ATP・GTP 量を HPLC により解析したところ、ATP・GTP 両者のレベルの低下が見られた。これらのことから、抑圧変異 *prs* によって Prs の機能低下が生じ、 正味の GTP レベルを低下させ、アミノ酸飢餓への適応性を回復させていることが示唆された。すなわち、プリンヌクレオチド生合成経路の初発酵素である Prs による栄養状態に応じた細胞内 GTP レベルの変化・恒常性維持を制御する新たな機構の存在が考えられた
　また、抑圧変異株 *prs* においてどのような遺伝子発現変化が生じ、アミノ酸飢餓への適応性を回復させたのかを解析するため、冨栄養条件及びアミノ酸飢餓誘導条件において野生株、$ppGpp^0$ 株と比較して変化した転写産物量を RNA-seq を用いて網羅的に解析した。本大会ではこの解析結果も併せて報告する。

stringent responce, GTP biosynthesis, Bacillus subtilis

講演番号：2A02p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A02 会場

深海好圧性細菌 Shewanella violacea におけるペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析

Characterization of a peptide transporter from deep-sea piezophile Shewanella violacea in an Escherichia coli expression system.

○根來 将吾[1]、翠川 雄斗[1]、加藤 千明[2]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)
○Shogo NEGORO[1], Yuto MIDORIKAWA[1], Chiaki KATO[2], Fumiyoshi ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】深海は高水圧と低温にさらされ、かつ栄養源の乏しい極限環境である。従属栄養細菌がこうした貧栄養環境で窒素源を獲得する 1 つの手段として、私たちはペプチド輸送体に着目した。大気圧下で栄養源豊富な環境に棲息する細菌のペプチド輸送体と比較し、何らかの特殊化がなされている可能性を考えたからである。深海性好圧性細菌 *Shewanella violacea* のゲノムデータベースで、常圧菌 *Shewanella oneidensis* のペプチド輸送体 $PepT_{So}$ のホモログを検索したところ、複数のペプチド輸送体が見いだされた。その 1 つを $PepT_{Sv1}$ と名付け解析を行うことにした。興味深いことに、$PepT_{Sv1}$ の膜貫通領域 (TMD) 3 と 4 をつなぐ細胞外領域に、約 30 アミノ酸残基からなる長いループの存在が予測された。そこで本研究では、$PepT_{Sv1}$ を大腸菌内で発現させペプチド輸送活性を調べるとともに、このループの役割や TMD 内の重要なアミノ酸残基の同定を目的として解析を行った。

【方法】*S. violacea* DSS12 株のゲノム DNA を鋳型として $PepT_{Sv1}$ 遺伝子を PCR で増幅した。この PCR 断片を pCold TF ベクターに導入し、発現プラスミドを構築した。なお、大腸菌内発現の可視化のため、$PepT_{Sv1}$ の N 末端側に GFP を融合したプラスミドも作製した。得られたプラスミドを大腸菌 C43 株に導入し、15°C で IPTG による発現誘導を行った。また、$PepT_{Sv1}$ のペプチド輸送能を大腸菌内で検証するため、蛍光ペプチドβ-Ala-Lys (AMCA) を用いた取り込みアッセイを行った。

【結果】はじめに pCold I ベクターを用いて $PepT_{Sv1}$ の発現を試みたが、ウエスタンブロットでバンドは確認されなかった。そこで大腸菌の分子シャペロン Trigger factor (TF) を有する pCold TF ベクターを用いたところ、GFP- $PepT_{Sv1}$ の発現が確認され、大腸菌の細胞膜に局在することがわかった。次にβ-Ala-Lys (AMCA) を用いたペプチド取り込みアッセイを行った。その結果、GFP- $PepT_{Sv1}$ 発現株ではペプチド取り込みが確認されたが、$PepT_{Sv1}$ 発現株では確認されなかった。よって、融合した GFP が何らかの仕組みで大腸菌内での $PepT_{Sv1}$ の発現や活性に寄与したものと考えられる。現在、$PepT_{Sv1}$ の機能に重要なアミノ酸残基を同定するため、R36A、E447A および W474A 変異を導入し、ペプチド輸送能の解析を行っている。これらのアミノ酸残基は、相同部位が他の生物のペプチド輸送体でも保存されており、重要性が示唆されている。

Shewanella violacea, peptide transporter, high-pressure

講演番号：2A02p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A02 会場

清酒酵母のジペプチド輸送体の解析
Analysis of dipeptide transporter in sake yeast
○北村 憲司[1,2]、中川 奈南[2] ([1]広島大・自然科学研セ、[2]広島大・工)
○Kenji KITAMURA[1,2], Nanami NAKAGAWA[2] ([1]Hiroshima Univ. CGS, [2]Hiroshima Univ. Sch. Eng.)

【目的】　出芽酵母*S. cerevisiae*は、細胞外のジ・トリペプチドを、Ptr2(全生物に保存されたPOTファミリー輸送体)とDal5(アラントイン酸輸送体)を介して取込んでいる。加えて、一部のワイン醸造株のみが保有するFot1, Fot2(FOTファミリー輸送体)もジペプチド輸送能を持っている。各々は全く異なる輸送体ファミリーに属するため、我々はPtr2とFot1の基質選択性の差異について調べ、Phe-Aspは両輸送体の基質である一方で、メチルエステル体（人工甘味料のアスパルテーム）だとFOT特異的に認識・輸送されることなどを見つけている。ペプチド輸送体の特異性は厳密ではなく多様な基質を輸送できるため、ペプチド様構造を含むいくつかの抗生物質に関して、ペプチド輸送体による認識を調べた。また、菌株間の相違についても調べた。
【方法・結果】　様々な*S. cerevisiae*菌株自体や、各株から単離した*PTR2*もしくはワイン酵母(EC1118)由来の*FOT1*遺伝子を、PGKプロモーターで発現するプラスミドを導入した*ptr2*破壊実験室株(S288c)の形質を比較すると、ブラストサイジンSはPtr2に、ピューロマイシンはFOT輸送体に、より選択性を示すことがわかった。トリペプチド様構造のビアラホスに対しては、ワインや清酒醸造用株は実験室株に比べ高感受性だった。ワイン株(EC1118)の*FOT*遺伝子を破壊すると感受性が緩和され、逆に実験室株にFOT輸送体を強制発現させると高感受性化したことから、FOT輸送体はビアラホスを認識・取込む能力を有し、ワイン酵母の感受性に必要であることがわかった。
　一方、きょうかい７号(K7)などの清酒酵母はFOT輸送体遺伝子がないにもかかわらず、実験室株(S288c、Σ1278b)に比べ、なぜかビアラホスに高感受性を示す。主要なペプチド輸送体Ptr2と感受性との関連を調べると、ADHプロモーターでPtr2を高発現すると実験室株のS288cが高感受性になり、K7株の*PTR2*遺伝子をノックアウトすると逆に感受性が緩和された。またK7由来一倍体株とS288cの雑種二倍体は、K7側のPtr2に依存してK7株自体と同様の高感受性を示したため、清酒酵母のビアラホス高感受性にはK7型Ptr2が関係していることがわかった。
　各株由来の*PTR2*をクローン化したプラスミドで機能を比較評価すると、実験室株の*PTR2*も機能しているものの、K7株の*PTR2*を発現する方がジペプチドの取込み能が高かった。K7とS288cのキメラ*PTR2*遺伝子作成などにより、各株間の塩基配列の違いからK7型の特性に必要なSNPを特定した。このSNPによりK7型*PTR2*が優れた性質を示す理由も調べており、清酒醸造株と実験室株の比較から見えてきた両株のPtr2の違いについて報告する。

yeast, dipeptide transporter, peptide antibiotic

発表責任者：北村憲司（kkita@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A02p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A02 会場

栄養増殖と胞子形成のいずれにも関わる遺伝子の取得と解析

Isolation and characterization of genes involved in both sporulation and vegetative growth

○三浦 悠、中村 太郎（大阪市大院理）
○Yu MIURA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

<背景と目的>

分裂酵母は栄養飢餓条下で、栄養増殖過程から胞子形成過程へと移行する。これまで胞子形成過程に関わる遺伝子は多数取得されているが、そのほとんどは栄養増殖に必須ではない。そこで、我々は新たな胞子形成関連遺伝子の取得を試みるべく、栄養増殖、胞子形成のどちらにも関わる遺伝子の取得を試みた。

<方法と結果>

我々は、温度感受性かつ胞子形成欠損を示す変異株の取得を試みた。まず、温度感受性変異株約 600 株 [1]の接合型をヘテロタリックからホモタリックへと変換した。現在、122 株の接合型の変換を完了した。次に、これらの株の胞子形成過程を観察し、胞子経営に欠損を示す株をこれまでに 2 株取得した。原因遺伝子の取得を試みたところ、その 1 つは *stt4*$^{+}$ であった。*stt4*$^{+}$ は、ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼをコードする遺伝子であり、オルソログである出芽酵母 Stt4 は、液胞の形態維持やアクチン骨格などに関わっていることが知られている。また、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸は胞子形成に重要な役割を担うことから、*stt4*$^{+}$ は栄養増殖と胞子形成のどちらにも関わる遺伝子であることが示された。

現在、目的の変異株のさらなる取得と *stt4*$^{+}$ の胞子形成時の機能解析を進めている。

Reference
1) Azad *et al.* (1997) Molecular Biology of the Cell 8, 825-841

phospholipid, sporulation, yeast

発表責任者：三浦　悠（miuchin1019@icloud.com）

講演番号：2A02p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A02 会場

細胞内外のアスコルビン酸およびエリスロアスコルビン酸が出芽酵母 SOD1 欠損株に与える影響

The effects of extra- and intra-cellular ascorbate and erythroascorbate on growth in sod1-deficient budding yeast.

小柳 ゆかり、五十嵐 香澄、○尼子 克己（仁愛大人間生活）
Yukari Oyanagi, Kasumi Igarashi, ○Katsumi Amako (Jin-ai Univ.)

【目的】　出芽酵母は真核生物のモデル細胞として、生体成分の機能を明らかにする実験に用いられてきた。酸化ストレス状態における抗酸化物質の効果もそのひとつである。出芽酵母の細胞質型スーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)の欠損株は SD 合成培地での生育不良、種々の酸化ストレスに対する感受性を示し、それが外部からの抗酸化物質の添加によって緩和されることが報告されている。ここでは培地にアスコルビン酸(AsA)、あるいは AsA の前駆体等を加えることによって起こる細胞内外の AsA 濃度の変化と、それらが SOD1 遺伝子破壊株(sod1Δ)に及ぼす影響について検討した。
【材料と方法】　出芽酵母 YPH250 の sod1Δを①SD 合成培地に②AsA、③AsA および 20 mM MES-NaOH (pH6.2)、④L-ガラクトース(Gal)または⑤D-アラビノース(Ara)を加えて培養し、増殖の様子を OD590 で測定した。また①～⑤で 5 時間処理した対数期の細胞を回収し、細胞内の AsA およびエリスロアスコルビン酸(eAsA)を HPLC-ECD で測定した。酸化ストレス耐性は過酸化水素およびメナジオン処理後の、経時的寿命は SD+Met 培地における定常期以降の、それぞれ細胞生存率の変化をコロニー計数法で評価した。
【結果と考察】　Sod1Δは野生型株に比べ増殖速度および定常期の濁度が低下し、②～⑤の処理によってこれらは改善された。添加物の濃度を変化させて OD590 の経時変化を追跡し、①の無添加時に対する増殖速度の改善率を、細胞内 AsA・eAsA 濃度に対してプロットしたところ、④⑤に比べて②で極めて高い増殖速度改善効果を示した。さらに③では細胞内に AsA が検出されないにもかかわらず、同じ濃度で AsA を培地に加えたときに③よりも高い改善効果を示した。野生型株ではこれらの効果は見られなかった。Sod1Δ は④⑤処理でメナジオン耐性が改善したが過酸化水素耐性には影響を及ぼさなかった。Sod1Δ は④⑤処理で経時的寿命も延長した。出芽酵母ゲノムには既知の AsA 輸送体や Cytb561 還元酵素のホモログがなく、①では培養時間に伴って培地が酸性化することから、AsA や eAsA が細胞内で抗酸化作用を示すものの、培地に AsA を加えた場合には、細胞外に留まった AsA アニオンが sod1Δの酸化ストレス緩和に大きく寄与することが明らかになった。

ascorbic acid, superoxid dismutase, yeast

発表責任者：尼子克己（amakok@jindai.ac.jp）

講演番号：2A02p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A02 会場

炭素源の変化や枯渇により誘導されるオートファジーの機能

Roles of autophagy induced by transition or depletion of carbon sources

○岩間 亮、大隅 良典（東工大）
○Ryo IWAMA, Yoshinori OHSUMI (Tokyo Tech)

オートファジーは細胞内に備わっている分解システムであり、広く真核生物で保存されている。オートファジーにより、細胞質中のタンパク質や細胞小器官は選択的あるいは非選択的にオートファゴソームに取り込まれ、液胞に輸送されて分解される。近年、窒素源飢餓条件のみならず、様々な条件でオートファジーが誘導されることが明らかにされているが、それらオートファジーが細胞にどのような生理的意義を持つのかは理解されていない。これら多様な条件の中で、我々は炭素源とオートファジーの関係に着目した。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はグルコースを唯一の炭素源とする培地で増殖する際には、好気条件下でも解糖系のみを優先して駆動させ、エタノールを産生し続ける。グルコース枯渇後、*S. cerevisiae* は利用する炭素源をエタノールへと切り替え、好気呼吸による増殖に遷移する（ダイオキシックシフト）。ダイオキシックシフト時にはオートファジーが誘導されることが知られているが [1]、その役割には不明な点も多い。

以前、我々の研究グループは、グルコースを含む合成培地を用いて、ダイオキシックシフト時に生じるオートファジーが鉄のリサイクリングに関与することを示した [1]。しかし、この合成培地ではグルコースが枯渇する頃には様々な栄養素が不足し始めることが示されている。今回、我々は、純粋に炭素源のみが酵母の増殖に反映される培地条件でオートファジーの役割を再検討した。その結果、今回の培地条件においてもダイオキシックシフト時にオートファジーが生じることや、その時のオートファジーが酵母の呼吸増殖への遷移に影響を与えることが示された。また、この培地を用いることにより、エタノール増殖後の炭素源枯渇時の解析ができるようになり、その時にオートファジーが生じていることが示された。本発表では、これら炭素源の変動に関わるオートファジーについて議論を進める。

1) Horie T, Kawamata T, Matsunami M, Ohsumi Y. (2017) “Recycling of iron via autophagy is critical for the transition from glycolytic to respiratory growth” *J. Biol. Chem.*, **292**, 8533-8543.

Autophagy, Carbon metabolism, Diauxic shift

講演番号：2A02p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A02 会場

出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、藤原 祐気、平島 宗一郎、宮本 昭弘、柳本 敏彰、秦野 琢之（福山大生命工）
○Hiroaki MATSUZAKI, Yuki FUJIWARA, Soichiro HIRASHIMA, Akihiro MIYAMOTO, Toshiaki YANAMOTO, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のセントロメアはポイントセントロメアであり、動物細胞や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の多数の繰り返し配列からなるセントロメアとは異なる。我々は、*S. cerevisiae* において pSR1 プラスミドの R-RS 部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導するシステムを構築した。セントロメア DNA の切り出しは、一倍体細胞の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位（RS）を同じ方向に挿入し、ガラクトースにより R レコンビナーゼの発現を誘導して行う。レコンビナーゼの発現により生存率が大きく低下し、細胞死を誘導できた(生存率：1.4×10^{-5})。しかし、僅かな数の生存細胞が生じたので、生存細胞が出現するメカニズムを解析した。51 クローンの生存細胞のセントロメア DNA 近傍の PCR 解析や RS 領域のシークエンス解析から、主な出現メカニズムは、染色体から RS が 1 個欠失し、切り出しが起こらなかったことが示唆された。RS として使用した DNA の両端に TCGA 配列があるので、片方の配列を TA 配列に置換した結果、生存率がさらに低下し(生存率：2.3×10^{-6})、RS の欠失はある程度抑制された。RS の欠失は、それら 2 個の TCGA 配列を介して起こっている可能性が考えられた。また、生存細胞の中には、セントロメア DNA が切り出された細胞が低い割合で出現した(3 クローン)。これらの生存細胞の増殖速度は、切り出し前の株と顕著な差は認められなかった。パルスフィールドゲル電気泳動による染色体パターンの解析で生存細胞の第 IV 番染色体は少し短くなっている可能性が生じた。サザン解析から *CEN4* DNA は第 IV 番染色体から消失しているが、左腕テロメア近傍の *PHO13* 遺伝子と右腕テロメア近傍の *HSP31* 遺伝子は第 IV 番染色体に存在すると考えられた。切り出しの起こった生存細胞の出現メカニズムとして、*CEN4* DNA が切り出された後に他の染色体が融合してセントロメア DNA を獲得した可能性は低いことが示唆された。さらに、生存細胞の第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の位置や配列を解析し、出現メカニズムについて検討しようとしている。

cell death, centromere, surviving cell

発表責任者：松崎 浩明（matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2A02p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A02 会場

グルコース制限はスピンドルチェックポイント Mad1 の機能低下を引き起こす

Molecular function of Mad1 is regulated by glucose-limitation in fission yeast

○田部 卓磨、吉田 直己、谷添 万里子、川向 誠、松尾 安浩（島根大学）
○ TAKUMA TANABE, NAOKI YOSHIDA, MARIKO TANIZOE, MAKOTO KAWAMUKAI, YASUHIRO MATSUO (Shimane Univ)

炭素源は生物において必要不可欠な栄養素である。単細胞生物である分裂酵母は、細胞外環境の栄養物質の状態を素早く認識し、素早く対応する必要がある。cAMP/PKA 経路は、グルコース応答経路として知られ、酵母からヒトまで幅広く保存されたシグナル伝達経路である。分裂酵母において、プロテインキナーゼ A(PKA)は、調節サブユニットである Cgs1 と触媒サブユニットである Pka1 の複合体で成り立っている。炭素源が豊富な条件下でプロテインキナーゼ A は活性化される。分裂酵母では、有性生殖過程、糖新生およびストレス応答で機能している。

近年我々の研究室では、培地の炭素源のグルコース濃度を 0.1%にまで下げると細胞周期の有糸分裂期チェックポイントであるスピンドルチェックポイントの Mad1 の発現量が低下することを見出した。スピンドルチェックポイントは、有糸分裂期で正常な姉妹染色体分配を監視するシステムである。我々は、グルコース制限環境におけるスピンドルチェックポイントへの影響について、その意味を明らかにし、グルコース応答経路である cAMP/PKA 経路との関連性を解明することを目的としている。

グルコース制限下においてプロテインキナーゼ A の触媒サブユニットである Pka1 が不活性化される。そこで、グルコース存在下において、*pka1* 破壊株でのスピンドルチェックポイント因子の発現量を確認した。その結果、グルコース制限下と同様に Mad1 の発現量が低下することがわかった。また、Pka1 がリン酸化制御することがわかっている下流の転写因子 Rst2 を破壊するとこの発現量が戻ることがわかった。

グルコース制限下における Mad1 の発現量低下と *pka1* 破壊株における発現量低下がリンクしているかを調べるために、調節サブユニットである *cgs1* 破壊株と下流の転写因子 *rst2* 破壊株において、グルコース制限下における Mad1 の発現量が回復するか調べた。結果として、発現量低下が戻ることはなかった。これらのことから、*pka1* 破壊株において見られる Mad1 の発現量低下とグルコース制限下において見られる発現量低下は異なる現象であることが示唆された。実際の表現型としてグルコース制限下における染色体分配について観察した。その結果、Mad1 の発現量の低下にもかかわらず、染色体分配異常が確認できなかった。

今後は、Mad1 の発現量の低下がもたらすグルコース制限下における表現型を明らかにし、Mad1 の機能を明らかにしていく予定である。

glucose-limitation, Mad1, fission yeast

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A02p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A02 会場

出芽酵母の寿命制御に関わる Ssg1 の機能解析
Functional Analysis of Ssg1 Which Involved in the Regulation of Lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*

○益村 晃司[1]、竹内 悠人[2]、小川 貴史[2]、金井 宗良[3]、久米 一規[2]、水沼 正樹[2]([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研、[3]酒総研)
○Koji MASUMURA[1], Yuto TAKEUCHI[2], Takafumi OGAWA[2], Muneyoshi KANAI[3], Kazunori KUME[2], Masaki MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Grad. Sch., [3]NRID)

老化・寿命制御機構の解明は、生物学的老化の理解だけでなく、ヒトの健康維持・寿命延長の実現のために重要なテーマである。寿命制御機構は、酵母や線虫をはじめとする様々なヒトのモデルとなる生物を用いて解析が行われ、ヒトに共通する寿命制御因子、経路が多数発見されてきた。例えば、酵母を用いた解析から Target of Rapamycin 複合体 1(TORC1)経路、プロテインキナーゼ A(PKA)経路、Sir2 などが同定・提唱され、酵母の寿命研究における有用性が示唆されている。また、近年いくつかの代謝産物が寿命制御に関与することが報告され、代謝と寿命の関係が解析されている。

メチオニン代謝経路において、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)は、生体内の主要なメチル基供与体としてタンパク質、核酸、リン脂質など様々な物質のメチル化反応に利用される。SAM はメチル基を供与した後、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)となり、SAH は SAM のメチル化反応を競合的に阻害するため、SAH 水解酵素 *SAH1* によって速やかに分解される必要がある。我々は、*SAH1* 遺伝子に変異を有する *sah1* 変異株を取得し、顕著な増殖遅延と短命を示すことを見出した。そこで、*sah1* 変異株の増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを実施し、その抑圧変異株 *SSG1* (Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the *sah1*)を取得した。期待通り、*SSG1* 変異株は経時的寿命(定常期以降、分裂を停止した細胞が限られた栄養下で生存できる期間)が延長し、野生株に比べて SAM および SAH を高蓄積することが分かった。このことから、Ssg1 は SAM/SAH が関わる新規寿命延長因子であると予想し、Ssg1 の機能を明らかにすることを目的とした。

SSG1 変異の原因遺伝子は、機能未知の *ERC1* 遺伝子であった。変異点を調べたところ *SSG1* 変異は、*ERC1* 遺伝子内にフレームシフト変異が生じ、Erc1 より 36 アミノ酸分大きくなっていた。そこで、Ssg1 の N 末端に EGFP を融合した株を構築し、局在を観察した結果、Erc1 は明確な局在が観察されなかったが、Ssg1 は液胞膜に局在した。さらに、*SSG1* 株では液胞内に SAM/SAH が高蓄積した。これまでに、液胞の酸性化の維持が寿命延長に重要であることが報告されていることから、Ssg1 は液胞の酸性化の維持に関与するか解析を行った。その結果、液胞の酸性化を阻害する、V-ATPase(液胞型 ATP 分解酵素)阻害剤コンカナマイシン A の添加で、*SSG1* 変異株は増殖遅延を引き起こした。また、V-ATPase 制御サブユニット *VMA2* の破壊により、*SSG1* 変異株は短命となった。このことから、Ssg1 は液胞の酸性化の維持により、増殖制御を行っていることが予想された。現在、液胞の酸性化の維持と SAM/SAH 高蓄積と関連、さらにこれらによる寿命延長機構について解析を行っている。

Lifespan, *S*-adenosylmethionine, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2A02p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A02 会場

出芽酵母における圧力適応機構の解明
High-pressure adaptation of yeast
○望月 貴博、阿部 文快（青山学院大理工）
○Takahiro MOCHIZUKI, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】 ヒトの身体は血圧や脳圧といった小さなレベルから、膝や歯にかかる大きなレベルまで常に様々な圧力にさらされているが、細胞における圧力適応メカニズムについてはあまり理解されていない。我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、高水圧が細胞に及ぼす影響について調べてきた。これまでに、酵母のトリプトファン非要求性株が高圧条件下 (25 MPa; 約 250 気圧) で増殖可能であることや、高圧増殖を可能にする 84 個の遺伝子を同定してきた。しかし、そこには圧力を感知する「圧力センサー」のようなものは含まれていなかった。我々は最近、熱や浸透圧を感知するセンサータンパク質 Wsc1 の欠損株が高圧感受性を示すことを見いだした。Wsc1 が圧力センサーである可能性を考え、本研究では Wsc1 の圧力感知機構や圧力適応に重要なシグナル経路の探索を行なった。

【方法】 圧力を感知するために重要な Wsc1 の部位を調べるため、Wsc1 とそのファミリータンパク質 Wsc2、Wsc3 や Mid2、Mtl1 の細胞内外のドメインを互いに入れ換えたキメラセンサー発現プラスミドを作製し、高圧条件下 (25MPa で 48 時間培養) での増殖能を比較した。また、圧力適応に重要な経路を明らかにするため、Wsc1 の下流で働くシグナル経路に関連した遺伝子を欠損させ、高圧条件下での増殖能を調べた。

【結果】 Wsc1 の細胞内あるいは細胞外ドメインを他のセンサータンパク質と入れ換え、それらキメラセンサー発現プラスミドを *wsc1*Δ株に導入し、高圧条件下での増殖能を調べた。その結果、細胞外ドメインがどのセンサータンパク質由来であっても *wsc1*Δ株の高圧感受性は相補された。一方、細胞内ドメインは Wsc1 由来でなければ高圧下で増殖できなかった。以上の結果より、Wsc1 の細胞外ドメインが圧力を感知し、細胞内ドメインを介して圧力適応を可能にしているという作業仮説を立てた。次に Wsc1 の下流で機能する低分子量 G タンパク質 Rho1 の GEF である Rom2 の欠損株を高圧下で培養したところ、高圧感受性を示した。このことから、Wsc1 が圧力の増大を感知して Rho1 を制御し、細胞内に何らかのシグナルを伝達することが示唆された。現在、Rho1 の下流で働く遺伝子の欠損株を用いた高圧増殖試験や、Wsc1 の細胞外ドメインに変異を導入した変異型 Wsc1 発現プラスミドを作製し、圧力を感知するために重要な部位の探索を行なっている。

high-pressure, membrane-spanning sensors, small GTP-binding protein

講演番号：2A02p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A02 会場

出芽酵母トリプトファン輸送体 Tat2 における基質輸送活性とユビキチン依存性分解
Activity-and ubiqutination-dependent degradation of the yeast tryptophan permease Tat2
○石井 凌賀、天野 香織、野際 佳奈、今村 恵莉、望月 貴博、阿部 文快（青山学院大理工）
○ Ryoga ISHII, Kaori AMANO, Kana NOGIWA, Eri IMAMURA, Takahiro MOCHIZUKI, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】出芽酵母の Tat2 は 12 回膜貫通型の高親和性トリプトファン輸送体である。この輸送体は高水圧や低温、あるいは数種の化学物質など様々なストレスに超感受性を示し、その結果、トリプトファン要求株の増殖は制限される。また、輸送基質を細胞に過剰投与すると Tat2 は分解される。私たちはこれまで、Tat2 のトリプトファン輸送能や高圧ストレス下での細胞増殖に関わる多数のアミノ酸残基を同定してきた。しかし、それらアミノ酸残基の変異が Tat2 の分解にどのような影響を及ぼすのかはわかっていない。そこで本研究では、基質投与による Tat2 分解機構の解明を目的とするとともに、それが外因性ストレスによる Tat2 の分解誘導とどのようにクロストークしているのかについて、多数の変異型を調べることで明らかにしようと考えた。

【方法】トリプトファン要求性株において Tat2 機能に失陥がある場合、その変異株は低トリプトファン（4 μg/mL）培地で増殖できない。一方、Tat2 はユビキチン化による分解が変異により遅延すると細胞膜上に蓄積し、結果として変異株は 25 MPa（約 250 気圧）で増殖するようになる。こうした 2 つの性質を利用して、Tat2 の機能と分解を評価した。また、Tat2 の分解についてはガラクトース誘導性プロモーターを用い、グルコースを投与して *TAT2* の転写を抑制すると同時に、トリプトファンあるいはストレスを与えた後、Tat2 の分解をウエスタンブロッティングにより解析した。

【結果】トリプトファン投与後の Tat2 分解について、野生型と機能失陥を伴う変異型を比較したところ、分解パターンは 2 つに大別されることがわかった。1 つめは E286Q 変異のように野生型 Tat2 に比べ分解が著しく遅延するものであり、2 つめは E178Q 変異のように単にグルコースを投与するだけで速やかに分解されるものである。私たちは基質輸送時に Tat2 が構造変化し、その際 N 末端ドメインが細胞質に露出するため Rsp5 ユビキチンリガーゼの標的になるというモデルを提唱する。前者の変異型の場合、輸送機能が失陥しているため、ユビキチン化されるべき N 末端ドメインが露出しない可能性が考えられる。後者については、変異による Tat2 構造の不安定化が Rsp5 による品質管理の対象となった可能性が考えられる。現在、細胞にストレスを負荷したときの Tat2 の分解が変異によりどのような影響を受けるのかを解析し、これを基質投与による分解と比較することで、Tat2 分解の細胞内クロストークを解明しようと考えている。

Saccharomyces cerevisiae, tryptophan permease Tat2, ubiquitination

講演番号：2A03a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A03 会場

細胞表層構造に着目したカビ制御検討
Study on relationship of fungicide susceptibility and fungal cell-surface structure
○西本 光穂子[1]、田邊 弘毅[2]、原 光志[3]、田中 亮子[3]、阪井 達哉[1]、井上 滋登[3]、久保田 浩美[2]、伊藤 将嗣[1]([1]花王（株）ハウスホールド研、[2]花王（株）安全性科学研、[3]花王（株）解析科学研)
○Mihoko NISHIMOTO[1], Hiroki TANABE[2], Teruyuki HARA[3], Ryoko TANAKA[3], Tatsuya SAKAI[1], Shigeto INOUE[3], Hiromi KUBOTA[2], Masatsugu ITO[1] ([1]Kao Corp. Household Products Research, [2]Kao Corp. Safety Science Research, [3]Kao Corp. Analytical Science Research)

【背景・目的】浴室・洗面所、トイレ、キッチン、リビング等の住環境の様々な場面でカビ汚れは存在する。中でも、住環境で検出頻度が高く、カビ汚れの主な原因となる *Cladosporium* 属等のカビは一般細菌と比較して、殺菌剤に対する耐性が高いために制御が難しい場合が多い。本発表では、カビ胞子と一般細菌の細胞表層構造の違いに着目し、殺菌剤の浸透性を高めることにより殺カビ効果を向上させた結果について報告する。
【方法と結果】*Cladosporium* 属、*Aspergillus* 属、*Phoma* 属等、複数種のカビをそれぞれ PDA 培地にて 25℃で培養後、その胞子懸濁液を調製し、殺菌剤と室温で所定時間接触させることで、殺胞子試験を行った。カビ胞子の細胞表層構造は、ハイドロフォービン層、メラニン層、多糖層等によって構成される。これらの構成要素と殺胞子試験から得られた殺菌剤耐性の関連性について検討した結果、試験に供した範囲では *Cladosporium* 属等の殺菌剤に比較的高耐性を示すカビは、クラスⅠのハイドロフォービンを有しており、ハイドロフォービン層の構造と薬剤耐性の関連性が示唆された。クラスⅠのハイドロフォービンはアミロイド様の線維状構造体を形成するタンパク質であることが知られているため、このタンパク質の高次構造に着目し、影響を与える物質を探索した。その結果、特定の無機塩を作用させた際に、胞子表面のハイドロフォービン層に乱れが生じることが原子間力顕微鏡（AFM）により確認された。そして、無機塩を添加してハイドロフォービン層が乱れた状態の胞子に殺菌剤を接触させたところ、無機塩を添加しない場合に比べて殺カビ効果が向上すること、その際にはカビ胞子内への殺菌剤の浸透量が増加していることを確認した。

hydrophobin, *Cladosporium* sp., cell surface structure

講演番号：2A03a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母の核サイズ制御機構の解析
Study on nuclear size control in fission yeast
○中垣 裕作[1]、水沼 正樹[2]、久米 一規[2] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研)
○Yusaku NAKAGAKI[1], Masaki MIZUNUMA[2], Kazunori KUME[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. grad. sch.)

【目的】膜で覆われたオルガネラは、細胞増殖時に細胞サイズに比例して変化し、適切な大きさで維持されている。しかし、その制御機構の詳細は不明である。オルガネラの 1 つである核は、ほとんどの細胞においてただ 1 つ存在し、シンプルな形態ゆえ、細胞増殖時のオルガネラの成長およびサイズ恒常性を研究する上で有用なモデルである。我々は、オルガネラサイズの制御機構を理解するため、分裂酵母を用いて、核サイズ制御に関する研究を行っている。

ほとんどの真核細胞の核サイズは、細胞サイズに比例して変化することが報告されているが、核サイズ制御機構の実体は不明である。近年、分裂酵母を用いた研究から、野生株の N/C ratio（核と細胞の体積比）は 0.08 を示し、細胞周期を通して一定に保たれることが報告された。さらに、N/C ratio は、自身の DNA 含量には影響を受けず、核周辺の空間の大きさに依存して変化することが示唆された。しかしながら、何が核サイズを決定し、制御するのかについては不明である。

これまでに我々は、核サイズ制御機構を明らかにするために、分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーや温度感受性変異株の中から、核サイズ変異体（N/C ratio 変異体）を複数取得し、順次解析を行ってきた。そして、mRNA やタンパク質の核内蓄積や核膜の異常供給が、核の肥大化を引き起こすことを明らかにした。本研究では、N/C ratio 増加変異体の解析を通して、核サイズ制御機構の全体像の理解および、核サイズ制御に重要なシグナル伝達経路の解明を目指した。

【方法・結果】核サイズ制御機構の全体像を理解するため、取得した核サイズ増加変異体間での核サイズ制御における遺伝学的関係について調べた。具体的には、mRNA やタンパク質の核内蓄積により N/C ratio が増加する変異体（*rae1-167*）を中心に、未解析の N/C ratio 増加変異体との二重変異体を構築し、N/C ratio を測定した。その結果、単独変異体よりも N/C ratio が増加する二重変異体が複数存在した。これらの N/C ratio 増加変異体は、*rae1-167* 変異体とは異なる要因（別経路）により核サイズが肥大化していることが示唆された。現在、別経路が示唆された N/C ratio 増加変異体間での遺伝学的関係について調べている。さらに、核サイズ制御におけるシグナル伝達経路を明らかにするために、タンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）に注目し、キナーゼ破壊株と N/C ratio 増加変異体との二重変異体の N/C ratio を調べることにより、核サイズ制御に関わるキナーゼを探索している。

fission yeast, nuclear size, cell size

講演番号：2A03a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A03 会場

出芽酵母細胞壁β-1,6-グルカン合成関連タンパク質の相互作用の解析
Alalysis of interaction of proteins associated with synthesis of ß-1,6-gulcan, cell wall component of *Saccaromyces cerevisiae*

○難波 聖人[1,2]、足立 博之[1]、依田 幸司[1]、鎌倉 高志[2]、野田 陽一[1] ([1]東大院・農生工・応生工、[2]東理大・理工)
○Masato NAMBA[1,2], Hiroyuki ADACHI[1], Koji YODA[1], Takashi KAMAKURA[2], Youichi NODA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

［目的］
実験モデル生物であり、産業的にも広く利用される出芽酵母の知見が増えることによって、新たな技術や利用法の確立につながるのではないかと期待される。出芽酵母細胞壁はマンナンタンパク質、β-1,3-グルカン、β-1,6-グルカン、キチンから構成されている。β-1,6-グルカンは乾燥重量にして細胞壁の約 10%を占め、構成成分を互いにつなぎとめる役割を持つことが知られているが、その合成機構には不明な点が多数残されている。その合成機構の一端を解明することを本研究の目的とした。具体的に本研究では、β-1,6-グルカンの合成に関わるとされる Kre (Killer toxin REsistance)タンパク質のうちβ-1,6-グルカンの合成の中心的役割を持つと推測されている Kre5, Kre6, Kre9 に着目した。Kre5 は 1365 アミノ酸からなる UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase(UGGT)の酵母ホモログであり小胞体に局在する。Kre6 は 720 アミノ酸からなる Glycoside Hydrolase Family 16(GH16)に相同性のあるⅡ型膜貫通タンパク質であり、小胞体と細胞質膜に存在する。Kre9 は 276 アミノ酸からなる、N 末端にシグナル配列を持ち、O-糖鎖修飾を受け、高発現させると細胞膜表層まで輸送される分泌タンパク質である。本発表では、これらの相互作用を免疫沈降によって調べた結果について報告する。
[方法と結果]
染色体上から Kre9-3HA を発現させて免疫沈降を行い、Kre6 との相互作用について調べた。Triton X-100 で可溶化した膜から HA、Kre6 どちらに対する抗体で免疫沈降を行っても Kre6 と Kre9 の相互作用を示唆する結果が得られた。これは 2015 年度の本大会で我々のグループが発表した内容と調和的である。さらに、Kre9 を切断すると予想されるゴルジ体プロテアーゼ Kex2 をコードする遺伝子の欠損株の免疫沈降の結果から、これらがゴルジ体以降で相互作用していることが予想された。次に、Kre6 と Kre5 の相互作用について、Triton X-100 で膜を可溶化し、抗 Kre6 抗体で免疫沈降、抗 Kre5 抗体で検出して調べたところ、野生型株では非常に弱い相互作用が、また、細胞壁合成関連の変異株においては強い相互作用が検出された。最後に、種々のβ-1,6-グルカン合成関連遺伝子変異株において、Kre9-6xHis を高発現させ、ウェスタンブロッティングによって検出し、その挙動を比較したところ、Kre6 の機能不全を起こす変異体において Kre9-6xHis の挙動に共通した変化が見られた。これらのことから、Kre6 が小胞体において Kre5 と相互作用し、その後ゴルジ体以降で Kre9 と相互作用し、β-1, 6-グルカンの合成を行うことが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, cell wall, Golgi

発表責任者：野田陽一（anoday@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A03 会場

紡錘体微小管形成における 14 型キネシンファミリータンパク質の役割
Roles of Kinesin-14 family motors in bipolar spindle formation
○湯川 格史[1,2]、山田 侑亮[1]、山内 智瑛[1]、登田 隆[1,2]([1]広島大・院先端研・分子生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点)
○Masashi YUKAWA[1,2], Yusuke YAMADA[1], Tomoaki YAMAUCHI[1], Takashi TODA[1,2] ([1]Dept. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

染色体の均等分配には、有糸分裂期における紡錘体微小管の形成が必須である。その双極性構造は、微小管モーター蛋白質であるプラス端方向性５型キネシンとマイナス端方向性１４型キネシンの拮抗作用によって形成・維持されると考えられている。多くの生物で５型キネシンは単一遺伝子によってコードされているのに対して、１４型キネシンはホモログでない複数の遺伝子がコードしている。しかし、これら１４型キネシンメンバー間の分子機能の共通性および差異は不明である。

分裂酵母には二種の１４型キネシン（Pkl1 および Klp2）が存在する。これまで我々は Pkl1 が紡錘極体（SPB）に局在して微小管マイナス端を安定に SPB につなぎとめ（1)、しかも生育に必須な５型キネシン *cut7* 破壊株が *cut7pkl1* 二重変異株ではその生育が可能となることことを明らかにしてきた（2)。一方、Klp2 は紡錘体微小管上に局在するが、その細胞機能−紡錘体形成への寄与、Cut7 との相互作用−については解析されていない。そこで、本研究では Pkl1 と Klp2 の局在性の違いに着目し、紡錘体形成における両分子の機能的相違について調べた。また、ヒト１４型キネシン HSET を分裂酵母で発現させた際の機能的互換性についても精査した。本発表では、紡錘体形成における１４型キネシンファミリーメンバーの特異的役割について報告したい。

1. Yukawa et al., *J. Cell Biol.*, 209:549-562. (2015)
2. Yukawa et al., *Mol. Biol. Cell*, 28:3647-3659. (2017)
3. Yukawa et al., *J. Cell Sci.*, DOI:10.1242/jcs.210740. (*online*)

bipolar spindle formation, kinesin motor, microtubule

発表責任者：湯川格史（myukawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A03a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母の胞子細胞膜にみられる特徴的な陥入構造の形成に関わる F-BAR ドメインタンパク質 Pil2 の解析

Characterization of the F-BAR domain protein Pil2 related to formation of the invagination structure of the spore plasma membrane in fission yeast

○箕面 凪砂[1]、田原 悠平[1,2]、宮田 真人[1,2]、中村 太郎[1]（[1]大阪市大・院理、[2]大阪市大複合先端研究機構）
○Nagisa MINOMO[1], Yuhei TAHARA[1,2], Makoto MIYATA[1,2], Taro NAKAMURA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA)

背景と目的

分裂酵母の胞子は、様々な環境ストレスに対して耐性をもつ休眠細胞であり、その表面は、金平糖のような凸凹とした構造をしている。我々は、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により、胞子細胞膜に深い溝のような特徴的な陥入構造が多数存在していることを発見した。

本研究は、胞子に特異的にみられる陥入構造がどのような役割を果たしているのか、その構築に関わる遺伝子の取得と解析を通して明らかにすることを目的とする。

方法と結果

我々はプロテオーム解析により、胞子に特異的に含まれるタンパク質を数多く同定している(2016 年度大会)。その中で、細胞膜の陥入構造の形成に関わるとされる F-BAR ドメインタンパク質である Pil2 に注目した。

Pil2 の局在を観察したところ、Pil2-GFP のシグナルは、胞子表面に直線状に観察された。この局在は、電子顕微鏡下で観察された陥入構造と似ていた。また、*pil2* 遺伝子の破壊株を作製して、その形質を調べたところ、接合率、胞子形成率、発芽率、いずれも野生型株と差がみられなかった。さらに、*pil2* 破壊株の胞子を急速凍結レプリカ電子顕微鏡法で観察したところ、胞子の凸凹構造がより平らになっていることがわかった。現在、*pil2* 破壊株での胞子細胞膜の陥入構造の観察を行っている。

yeast, spore, eisosome

講演番号：2A03a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A03 会場

酵母における小胞体からミトコンドリアへのステロールの輸送機構
Sterol transport from endoplasmic reticulum to mitochondria in yeast
田 スチ[1]、太田 明徳[2]、堀内 裕之[1]、○福田 良一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応生化)
Siqi TIAN[1], Akinori OHTA[2], Hiroyuki HORIUCHI[1], ○Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Chubu Univ)

ステロールは、真核生物の生体膜を構成する主要な脂質の 1 つである。ステロールは細胞膜や様々なオルガネラ膜に含まれているが、その含量は膜ごとに維持されており、そのことが膜の構造と機能に重要であると考えられている。一方で、ステロールの合成は小胞体でのみ行われることから、細胞膜およびオルガネラ膜のステロール含量の維持には、小胞体からそれぞれの膜へのステロール輸送が重要であると考えられる。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、主要ステロールであるエルゴステロールはミトコンドリアにも含まれており、その形態に重要であることが示されているが(1)、小胞体で合成されたステロールがどの様にミトコンドリアへ輸送されるのかは未解明である。ステロールの細胞内輸送の研究が遅れている理由として、ステロール輸送を簡便に評価する系がないことが挙げられる。我々はこれまでに、酵母のステロールアシル化酵素欠損株において、細菌由来のステロールアシル化酵素 SatA に酵母のミトコンドリア内膜タンパク質 Pet100 のミトコンドリア移行シグナルおよび膜貫通領域と EGFP を連結した融合タンパク質（Mito-SatA-EGFP）を発現させることにより、ミトコンドリアにステロールアシル化酵素を局在させることに成功した。この株ではステロールが Mito-SatA-EGFP に依存してステリルエステルに変換されたことから、この系を用いることにより、ステロールのステリルエステルへの変換を指標に、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を解析できると考えられた(2)。

本研究では、この系を応用し、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vitro* で解析する系を構築し、その機構を解析した。まず、酵母から精製した小胞体膜を用いて[^{3}H]メチオニンの存在下 *in vitro* で[^{3}H]標識ステロールを合成させた。[^{3}H]標識ステロールを含む小胞体に mito-SatA-EGFP を発現させた株から精製したミトコンドリアおよび細胞質画分を添加したところ、[^{3}H]標識されたステリルエステルが検出されたことから、小胞体からミトコンドリアへ *in vitro* で[^{3}H]標識ステロールが輸送されたことが示唆された。さらにこの系を用いた解析から、酵母のオキシステロール結合タンパク質ホモログが小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送に関与することが示唆されたので、あわせて報告する。

(1) Altmann, K. and Westermann, B., *Mol. Biol. Cell*, **16** 5410-5417 (2005)
(2) Tian, S., Ohta, A., Horiuchi, H., and Fukuda, R., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **79** 1608-1614 (2015)

Saccharomyces cerevisiae, sterol, oxysterol-binding protein homolog

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A03 会場

Saccharomyces cerevisiae における Sec14 ファミリータンパク質 Sfh1 によるホスファチジルセリンのオルガネラ間輸送機構の解析
Interorganellar phosphatidylserine transfer by Sec14 family protein Sfh1 in *Saccharomyces cerevisiae*

○水池 彩[1]、小林 新吾[1]、堀内 裕之[1]、太田 明徳[2]、福田 良一[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応生化)
○ Aya MIZUIKE[1], Shingo KOBAYASHI[1], Hiroyuki HORIUCHI[1], Akinori Ohta[2], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Chubu Univ.)

真核生物の生体膜の主要構成成分であるリン脂質の生合成経路には、CDP-DAG 経路とケネディ経路が存在する。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、CDP-DAG 経路では小胞体膜上で合成されたホスファチジルセリン (PS)がミトコンドリアあるいはエンドソームに輸送され、Psd1 あるいは Psd2 による脱炭酸を受けてホスファチジルエタノールアミン (PE)に変換される。さらに、PE は小胞体に輸送され Pem1、Pem2 によるメチル化を受けてホスファチジルコリン (PC)に変換される。このように、リン脂質合成酵素は様々な細胞小器官に局在しており、リン脂質合成には細胞小器官間のリン脂質輸送が重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細には未解明な部分が多い。近年、細胞小器官間の方向性を持った脂質輸送にメンブレンコンタクトサイトや脂質輸送タンパク質が関与するというモデルが提唱され、研究が進められている。

S. cerevisiae においてミトコンドリアの PE 合成酵素をコードする *PSD1* を破壊した株は、ミトコンドリアの PE 不足のため呼吸機能が欠損し、乳酸などの非発酵性炭素源培地での生育が悪化することが知られている。*psd1*Δ株の非発酵性炭素源培地での生育は、培地へのエタノールアミンの添加によりケネディ経路による小胞体膜上での PE 合成を亢進させることで回復することから、細胞内には他の細胞小器官で合成された PE をミトコンドリアに輸送する機構が存在すると考えられる。我々は *psd1*Δ株の乳酸培地でのエタノールアミン要求性を抑圧するマルチコピーサプレッサーとして *SEC14* ホモログの 1 つである *SFH1* を取得した。先行研究により、Sec14 は *in vitro* でホスファチジルイノシトール (PI)、PC 輸送活性を有するのに対し、Sfh1 は *in vitro* で PI、PC をほとんど輸送しないことが報告されている。我々はこれまでに、*SFH1* の高発現により細胞内及びミトコンドリアの PE 量が部分的に回復すること、*SFH1* がサプレッサーとして機能するためにはケネディ経路は必須ではないが、Psd2 が必須であることなどを報告した。しかしながら、Sfh1 の機能や生理的意義については不明であった。

今回、Sfh1 の酵母細胞内での結合リン脂質の解析、細胞内局在解析、Sfh1 による *in vitro* でのリポソーム間のリン脂質輸送解析、*psd1*Δ*sfh1*Δ株の生育および脂質組成解析の結果から、Sfh1 が小胞体で合成された PS を Psd2 が局在するエンドソームに輸送することにより PE 合成を亢進させる可能性が示唆されたので報告する。

Saccharomyces cerevisiae, Phosphatidylserine, Sec14 family

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A03 会場

n-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* の Sec14 ファミリータンパク質の機能解析
Functional analysis of genes encoding Sec14-family proteins in *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*
○渡邉 夏仁、水池 彩、堀内 裕之、福田 良一（東大院・農生科・応生工）
○Natsuhito WATANABE, Aya MIZUIKE, Hiroyuki HORIUCHI, Ryouichi FUKUDA (Univ. of Tokyo　Dept. of Biotechnology)

n-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は *n*-アルカンや脂肪酸などの疎水性化合物を単一の炭素源として生育できる酵母である。*Y. lipolytica* を *n*-アルカンを炭素源として培養すると、*n*-アルカンの代謝に関わる遺伝子の転写が活性化されるとともに、偽菌糸生長が誘導される。これまで我々のグループにより行われた *Y. lipolytica* における網羅的転写解析から、*Saccharomyces cerevisiae* の Sec14 ファミリータンパク質遺伝子の 1 つである *SFH2* と高い相同性を示す *YALI0C17545g*、*YALI0E23430g*、*YALI0C05511g* の転写産物の量が *n*-デカン存在下で増加することが示された。そこで、これらをそれぞれ *SFH2A*、*SFH2B*、*SFH2C* と命名し、*Y. lipolytica* の *n*-アルカン資化における役割について解析を行った。

これら *SFH2* オルソログの単独、多重破壊株を作製し、その生育を観察したところ、*SFH2A* 破壊株、*SFH2A-C* 三重破壊株では、野生型株と比較して *n*-ドデカンを炭素源とした培地での生育が悪化した。また、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地では野生型株は菌糸状の生育を示したのに対して、これら破壊株は菌糸状の生育を示さなかった。また、これらの株の細胞形態を観察したところ、*SFH2A* 破壊株、*SFH2A-C* 三重破壊株では、野生型株と比較して *n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地で菌糸型の細胞形態を示す細胞の割合が低下した。これらの結果から、*Y. lipolytica* において *SFH2A* が *n*-アルカンに応答した細胞形態変化に関わることが示唆された。*SFH2A* 破壊株において、*SFH2B*、*SFH2C* を高発現したところ、*SFH2B* を高発現した場合に炭素源を *n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンとする培地で菌糸状の生育が回復したことから、*SFH2B* が *SFH2A* と一部重複した機能を有する可能性が示唆された。

Sec14 は *in vitro* で phosphatidylinositol (PI)や phosphatidylcholine (PC)を膜間で輸送する活性を持つ。Sec14 ファミリータンパク質の生理機能は未だ明確ではないが、PI を膜から引き抜き PI キナーゼに提示することにより phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)生産を促進するという仮説が提唱されている。そこで、*S. cerevisiae* の Osh2 タンパク質の PH ドメインに EGFP を連結した融合タンパク質を発現させて、PI4P の細胞内分布を観察したところ、野生型株を *n*-アルカン培地で培養した場合には細胞膜近傍にシグナルが観察されたのに対して、*SFH2A-C* 三重破壊株では細胞膜近傍のシグナルが低下した。この結果から、*Y. lipolytica* の *SFH2* オルソログが PI4P 生産に関わる可能性が示唆された。

Yarrowia lipolytica, *n*-alkane, Sec14

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A03 会場

出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化における α-アレスチン Rod1 による認識とユビキチン化制御機構の解析
Mechanism of a glucose-induced ubiquitination of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 by the α-arrestin Rod1-Rsp5 complex in its glucose inactivation
○藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農・生物産業創生）
○SHOKI FUJITA, KATSUYA GOMI, TAKAHIRO SHINTANI (Tohoku Univ.)

細胞の原形質膜上には、多様な栄養源を取り込む輸送体や外界環境に対するセンサータンパク質が存在している。刻々と変化する外界ストレスに応答して、細胞はこれら膜タンパク質のラインナップを最適化することで恒常性を維持している。この最適化は遺伝子発現のオン・オフに加えて、選択的なエンドサイトーシス（分解）によってなされる。出芽酵母における多様な原形質膜輸送体の分解は、14 種類存在する α-アレスチンファミリータンパク質がユビキチンリガーゼ Rsp5 を選択的にターゲット輸送体にリクルートしユビキチン化することによって制御されている。出芽酵母は環境中へのグルコースの流入により、エネルギー生産を呼吸から発酵へとシフトさせる。その制御は、転写レベルのみならず、タンパク質レベルでも行われ、糖新生関連酵素や種々の炭素源輸送体はグルコース刺激によってすみやかに分解される。モノカルボン酸輸送体 Jen1 もその一つであり、グルコースに応答した転写抑制とタンパク質分解を受ける。近年、Snf1 グルコースシグナル伝達経路の制御下で、α-アレスチン Rod1 が Jen1 のユビキチン化を制御していることが報告された。しかし、グルコースシグナル依存的な Rod1 による Jen1 の認識機構は不明である。そこで、その詳細な機構を解明することを目的として解析を重ね、現在までに Rod1 が Jen1 の C 末端の 20 アミノ酸からなる領域（Jen1 C-tail）を認識していることを明らかにしてきた。本研究では、Rod1 による Jen1 の認識に伴うユビキチン修飾に着目し解析を行った。

本研究では、メチオニン輸送体 Mup1 に Jen1 C-tail を融合させたキメラ輸送体を用いて、Rod1 の Jen1 認識機構の解析を進めた。Mup1 は過剰のメチオニンに応答して α-アレスチン Art1 依存的にエンドサイトーシスされるタンパク質であるが、キメラ輸送体は Art1 を介したメチオニン濃度依存的なユビキチン化に加え、Rod1 支配下でグルコース誘導性のユビキチン化修飾を受けエンドサイトーシスされた。また、そのユビキチン化修飾は、Jen1 C-tail に存在しているリジン残基の変異によって抑制された。さらに、このアミノ酸置換変異を Jen1 へ導入すると Jen1 のグルコース依存的なユビキチン化とエンドサイトーシスが抑制された。以上の結果より、Jen1 C-tail は Rod1 による認識部位とユビキチン化部位を内包し、その融合により膜輸送体のエンドサイトーシスを誘発できるデグロンとして機能することが明らかとなった。

endocytosis, ubiquitination, α-arrestin

講演番号：2A03a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A03 会場

細胞内で凝集塊を形成する Gmp タンパク質の挙動と分子機構の解析

Analysis of behavior and molecular mechanism of Gmp proteins forming aggregates in cells

○寺島 知里、大山 拓朗、田淵 光昭、田中 直孝（香川大農・応用生物）
○Chisato Terashima, Takuro Oyama, Mitsuaki Tabuchi, Naotaka Tanaka (Kagawa Univ.)

細胞内のタンパク質生産過程の主要な経路である分泌経路で機能するタンパク質に注目して、欠損させる、もしくは過剰発現させることによりタンパク質輸送にどのような影響を及ぼすのか研究している。最終的には、分泌経路の機能を増強する条件を見つけ、酵母を用いた有用タンパク質生産の効率化を図ることを目指している。

当研究室では、分泌経路内のタンパク質を同定するために、ゴルジ体画分の TOF-MS 解析を行った。網羅的に同定されたタンパク質群の中から配列内に coild-coil 領域を持つ機能未知のタンパク質 Gmp1, Gmp2, Gmp3, Gmp4 を取得した。本研究では、互いに相同性が高いことから Gmp1, Gmp3, Gmp4 に着目し研究を行った。Gmp ファミリーに GFP を付加し過剰発現させたところ、細胞内の数か所に集約したドットが観察され、凝集体を形成していることが考えられた。その局在を明らかにするため、分泌経路内のオルガネラマーカータンパク質と共発現させたところ、後期分泌経路のオルガネラであるエンドソームにおいて、ゴルジ体への逆行輸送を担っているレトロマーの構成タンパク質の一つ、Vps35 と Gmp1 過剰発現時の凝集体の局在が一致した。さらに、Gmp1 を過剰発現させていない場合での Vps35 と比べ、Gmp1 過剰発現時の Vps35 が凝集体と同等の大きさのドット局在を示したことから、Gmp1 の過剰発現によりエンドソーム画分を肥大化していることが考えられた。また、yeast two-hybrid 法を用いた相互作用解析の結果、Gmp1, Gmp3, Gmp4 がそれぞれ相互作用しており、Gmp1 と Gmp3, Gmp3 と Gmp4 が相互作用していることが示され、Gmp ファミリーが複合体を形成していることが推察された。Gmp 過剰発現時の凝集機構を明らかにするため拡散条件を検討したところ、微小管合成阻害剤 TBZ の添加や、窒素飢餓条件での生育の結果、Gmp ファミリー過剰発現時の凝集体が細胞質中に拡散することが観察された。

Gmp ファミリーの過剰発現によりエンドソームの肥大化が誘導されることが証明されることで、エンドソームを介した選別輸送の機能促進や、ストレス応答の解明にもつながると予想している。さらに、エンドソームの大きさが変化することによる物質生産の効率化が考えられ、細胞種を超えた物質生産への適用に繋がることが期待できる。

S. pombe, secretory pathway, endosome

講演番号：2A03a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母 PQ ループファミリーStm1 の細胞内局在とアミノ酸輸送活性について

Characterization of PQ-loop family protein Stm1 in *Schizosaccharomyces pombe* .

○上田 大資、津山 愛美、笠井 瑠美、関藤 孝之、河田 美幸（愛媛大農）
○ Taisuke UEDA, Narumi TSUYAMA, Rumi KASAI, Takayuki SEKITO, Miyuki KAWANO-KAWADA (Ehime Univ.)

液胞は細胞内遊離アミノ酸の貯蔵コンパートメントである。出芽酵母において、栄養豊富条件では細胞全体の約 50%のアミノ酸が液胞内に存在し、特に塩基性アミノ酸はその 70～90%が液胞内に蓄積している。しかし塩基性アミノ酸が液胞内に高度に蓄積する生理的意義は分かっていない。複数のアミノ酸トランスポーターが液胞への塩基性アミノ酸取り込みに関わることが分かっていたが、これらの遺伝子多重破壊株においても有意な塩基性アミノ酸の取り込み活性が検出されることから、他の取り込み系トランスポーターの存在が示唆されていた。最近、PQ ループファミリータンパク質であるラットの PQLC2 が、リソソームにおけるアミノ酸輸送に関与することが報告された（Jezegou A *et al.* PNAS, 2012）。我々は出芽酵母 PQ ループファミリーの Ypq1 及び Ypq3 が、液胞へのリジン／アルギニン及びヒスチジンの取り込みにそれぞれ関与することを明らかにしている（Sekito T *et al.* BBB, 2014, Manabe K *et al.* BBB, 2016）。分裂酵母には PQ ループファミリーとして Stm1 が存在するが、Stm1 は G タンパク質共役型受容体であると報告されている（Chung KS *et al.* JBC, 2001）。しかし、各生物種の PQ ループファミリータンパク質についてアミノ酸配列の相同性をもとに系統樹を作成すると、Stm1 が出芽酵母 Ypq タンパク質及び哺乳動物細胞の PQLC2 と同じ系統グループに入ることから、Stm1 がこれらと同様にアミノ酸輸送に関与する可能性が考えられた。

そこで本研究では、Stm1 の生理機能を明らかにするために、まず GFP 融合型 Stm1 を分裂酵母に発現させ、その細胞内局在を調べたところ、GFP 蛍光と液胞膜特異的色素である FM4-64 との共局在が観察され、Stm1 が分裂酵母液胞膜に局在することが分かった。また出芽酵母においても過剰発現させた GFP 融合型 Stm1 は液胞膜に局在した。*STM1* 過剰発現株について液胞内アミノ酸含量の測定を行ったところ、液胞内のアルギニンおよびヒスチジン含量の有意な減少を示した。分裂酵母からの液胞膜小胞単離法は確立していないため、*STM1* を過剰発現させた出芽酵母から単離した液胞膜小胞を用いてアミノ酸輸送活性の測定を試みた。その結果、*STM1* 依存的なアルギニンの取り込み活性が検出され、一方でヒスチジン取り込みが抑制された。以上の結果は分裂酵母 Stm1 が液胞膜に局在し、塩基性アミノ酸の輸送に関与していることを示唆する。

Vacuole, Transporter, Amino acid

講演番号：2A03a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A03 会場

液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の発現調節と N 末端親水性領域を介した活性調節について
Transcriptional regulation and post-translational regulation through N-terminal hydrophilic region of vacuolar amino acid transporter Avt4
○佐藤 明香音、村上 瑛夢、兵頭 美波、児玉 理美、佐藤 有美香、石本 晶也、河田 美幸、関藤 孝之（愛媛大農）
○Akane SATO, Emu MURAKAMI, Mina HYODO, Satomi KODAMA, Yumika SATO, Masaya ISHIMOTO, Miyuki KAWANO-KAWADA, Takayuki SEKITO (Ehime Univ.)

液胞内アミノ酸プールは栄養条件に応答して変化することが示されている。これには液胞膜を介したアミノ酸輸送を行うトランスポーターの活性調節が関与し、サイトゾル中アミノ酸濃度の恒常性に寄与すると考えられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 は中性／塩基性アミノ酸を液胞外へと排出する。窒素飢餓条件での液胞内塩基性アミノ酸の急速な減少に Avt4 の発現が関与することから、同条件での活性化が想定されている。我々は染色体から発現した *AVT4* mRNA が窒素飢餓条件で GATA 転写因子 Gln3 と Gat1 に依存して増加し、これと一致して Avt4 タンパク質レベルも増加することを明らかにしている。GATA 転写因子の結合配列（GATAA/T）は *AVT4* の上流 142 bp~335 bp の領域に 3 か所存在する。そこで本研究では 142 bp と 335 bp のプロモーターから GFP-Avt4 を発現するプラスミドを野生株と *gln3*Δ*gat1*Δ株へ導入し、細胞内の GFP-Avt4 タンパク質レベルを比較した。野生株において 335 bp プロモーターから発現した GFP-Avt4 タンパク質レベルは染色体からの発現同様、窒素飢餓条件で高かった。一方、142 bp プロモーターでは、窒素飢餓条件で 335 bp プロモーターと同レベルの GFP-Avt4 が検出されたとともに、栄養豊富条件での発現量増加も検出された。*gln3*Δ*gat1*Δ株では 335 bp と 142 bp いずれにおいても、窒素飢餓条件での GFP-Avt4 タンパク質レベルが野生株に比べて低下したが、栄養豊富条件では 142 bp プロモーターからの発現で野生株同様、高レベルの GFP-Avt4 が検出された。これらの結果は栄養豊富条件での発現抑制に *AVT4* の上流 142 bp と 335 bp の間の領域が重要であることと、Gln3/Gat1 以外の転写因子が *AVT4* の発現に関与する可能性を示唆する。現在、*AVT4* プロモーターの GATA 転写因子結合配列に変異を導入し、GFP-Avt4 タンパク質レベルへの影響を検討中であり、その結果についても報告する。

Avt4 には N 末端側に約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域が存在し、この領域を欠損すると液胞膜小胞からのアラニン排出が活性化した。他生物種ホモログとのアライメントにより、この領域中には 5 つの保存配列が見出され、各々の保存配列欠損変異型 Avt4 の発現株より単離した液胞膜小胞のアラニンの輸送活性を測定したところ、これら保存配列にはアラニン輸送活性に正に作用するものと負に作用するものがあることが見出された。このことは Avt4 が転写誘導だけでなく、翻訳後も N 末端親水性領域を介して調節されることを示唆する。

vacuole, transporter, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：関藤孝之（sekito@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2A03a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母シンタキシン 1 の局在変化に関わる遺伝子の大規模スクリーニング

Large-scale screening of genes involved in the translocation of syntaxin 1 in fission yeast

○増田 風子、中村 太郎（大阪市大院理）
○Fuko MASUDA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

背景と目的

細胞内物質のオルガネラ間の輸送や細胞外分泌等の際に必要な過程である膜融合には SNARE (soluble NSF attachment protein receptor complex)というタンパク質が関わっている。膜小胞上の v (vesicle)-SNARE が輸送先の細胞膜上の t (target)-SNARE と特異的に会合し、複合体を形成することで、膜小胞を目的の場所へ融合させることが出来る。シンタキシン 1 は t-SNARE の構成要素であり、高等生物ではシナプスにおいてこの過程に関わっている。分裂酵母では Psy1 がそのオルソログであり、栄養増殖時は細胞膜に局在して膜小胞の輸送に関わっている。

興味深いことに、Psy1 は胞子形成時に、母細胞の細胞膜から前胞子膜（胞子細胞膜の前駆体）へと局在を変化させる。その局在変化に伴い、膜小胞は前胞子膜へと移動の目的地を変え、それにより前胞子膜が伸長すると考えられる。本研究では、この Psy1 の局在変化に関わる因子をゲノムワイドな逆遺伝学的手法により特定し、その分子メカニズムを解明することを目的とする。

方法と結果

分裂酵母の生育に必須でない約 3000 の遺伝子破壊株セット [1)]で GFP-Psy1 の局在を 1 つずつ蛍光顕微鏡下で観察し、Psy1 の局在変化に異常が見られる 19 の株を得た。同定した遺伝子には、エンドソームの輸送選別に関わる ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)、オートファジー、アクチン細胞骨格に関わる遺伝子など、膜小胞輸送に関わるものが多くみられた。現在、これらの遺伝子のさらなる解析を進めている。

Reference
1) Ucisik-Akkaya *et al.* (2014) A genome-wide screen for sporulation-defective mutants in *Schizosaccharomyces pombe*

yeast, membrane, SNARE

発表責任者：増田 風子（osakana.chapun@gmail.com）

講演番号：2A03a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A03 会場

出芽酵母オートファジーにおける Ykt6 のオートファゴソームと液胞の融合への関与
Ykt6 contributes to autophagosome-vacuole fusion in the yeast Saccharomyces cerevisiae.
○浦野 真吾、菊地 のぞみ、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農・生物産業創成）
○Shingo URANO, Nozomi KIKUCHI, Katsuya GOMI, Takahiro SHINTANI (Tohoku Univ.)

マクロオートファジー（以下オートファジー）は栄養飢餓条件下に際し、細胞質成分を二重膜構造体オートファゴソーム内に包括し、液胞（動物細胞ではリソソーム）へ輸送し分解する機構である。その詳細な分子メカニズムは未解明な点が多いが、近年細胞内の小胞輸送において小胞とオルガネラの膜融合装置として働く soluble *N*-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor（SNARE）のオートファジーへの関与が示唆されている。Ykt6 は出芽酵母の生育に必須な SNARE であり、小胞体–ゴルジ体、ゴルジ体間、ゴルジ体–(エンドソーム)–液胞の小胞輸送に関与している。さらに、ある種の *ykt6* 温度感受性変異株ではオートファゴソーム形成に欠損があることが報告されている（Nair *et al.*, 2011）。一方、輸送小胞と液胞との融合において、Ykt6 は Vam3、Vam7 および Vti1（これらはオートファゴソームと液胞の融合に関与する事が知られている）などの SNARE タンパク質と複合体を形成することから、Ykt6 はオートファゴソームの形成だけでなく、オートファゴソームと液胞との融合にも関与している可能性が考えられた。そこで我々は複数の *ykt6* 温度感受性変異株（*ykt6-11*, *ykt6-12*, *ykt6-13*）を用いてオートファジーの解析を行った。その結果、*ykt6-11*、*ykt6-12* 変異株では制限温度下で、*ykt6-13* 変異株では生育温度にかかわらず、オートファジーが損なわれていることが分かった。さらに、蛍光顕微鏡解析や生化学的な解析により、*ykt6-13* 株ではオートファゴソームと液胞との融合に欠損があることが明らかとなった。

ykt6-13 株では、Vam3 の液胞への輸送経路である ALP 経路（ゴルジ体–液胞経路）や、CPY 経路（ゴルジ体–エンドソーム–液胞経路）などの複数の小胞輸送経路に欠損を持つことが分かっている。このことから、Vam3 の液胞への局在が損なわれているなどの間接的な理由によって、オートファゴソームと液胞の融合を不全に至らしめている可能性が考えられた。そこで、オートファジー特異的に欠損を示す変異体の取得を試みた。*ykt6-13* の持つ 5 つのアミノ酸置換変異を様々な組み合わせで復帰させた変異アレルを作製し、オートファジー並びに膜輸送経路の解析を行った。こうして得られた *ykt6-104* 株は 37°C でも正常に生育し、ALP 経路、CPY 経路も概ね正常であった。しかしながら、この変異株では 37°C におけるオートファゴソームと液胞の融合が損なわれていた。以上の結果から、*ykt6-104* 変異はオートファジーに特異的であり、Ykt6 がオートファゴソームと液胞の融合に直接的に関与していることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, Autophagy, SNARE

発表責任者：浦野真吾（shingo.urano.r8@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A03a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A03 会場

ミクロオートファジーを制御するユビキチン関連因子の探索

Researh of ubiquitination required for microautophagy

○中川 沙良、奥 公秀、阪井 康能（京都大学）
○Sara NAKAGAWA, Masahide OKU, Yasusyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】真核生物において液胞（リソソーム）は、タンパク質、脂質、アミノ酸、金属など、細胞内構成成分のリサイクリングに重要な役割を果たしているオルガネラである。ミクロオートファジーは液胞膜が陥入して直接、細胞質を取り込むオートファジー経路の一つであるが、*ATG* 分子群の必要なマクロオートファジーとは、その全く膜動態が異なっている。私たちは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 液胞膜 V-ATPase 膜貫通サブユニットである Vph1 と脂質滴が、ミクロオートファジーにより分解されることを明らかにし、そこにはマクロオートファジーに必要な *ATG* 遺伝子群が不要であることを報告した[1)]。さらにミクロオートファジーには、エンドソームにおける多胞体（multivesicular body）形成に必要な ESCRT タンパク質が必要であること、その中でも Vps27 と MVB 経路には影響の少ない Vps27 のクラスリン結合領域がミクロオートファジーには重要な働きをもつことを見出している。前年度の本大会においては、液胞膜上に局在するユビキチン化酵素が Vph1 の分解に必要である事を報告した。本研究ではミクロオートファジーに関わるユビキチン関連タンパク質を新たに探索することにより、ミクロオートファジーの分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ミクロオートファジー不能株と野生株から液胞を単離して液胞膜上のユビキチン化タンパク質を Western blot により解析したところ、ミクロオートファジー不能株では液胞膜上にユビキチン化タンパク質が蓄積することを見出した。さらに E3 リガーゼである Rsp5 に結合する液胞膜タンパク質の網羅的探索から、野生株では液胞内腔に存在し、ミクロオートファジー不能株では液胞膜に局在するタンパク質を見出した。Vph1-GFP cleavage assay の結果から本機能未知タンパク質は、Vph1 のミクロオートファジーによる分解を制御している事が示唆された。現在、野生株およびミクロオートファジー不能株から液胞画分を精製し、そこに含まれるタンパク質の質量分析を行う事によりミクロオートファジー誘導時にユビキチン化を受けるタンパク質を探索中である。

1) Oku, M. et al. *J. Cell Biol.,* **216,** 3263-3274 (2017)

autophagy, ubiquitinatioin

講演番号：2A03p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母における Rab ファミリーsmall GTPase Ypt2 の減数分裂特異的な局在機構の解析

Activation of the exocytic Rab GTPase Ypt2 is not essential for its meiosis-specific localization in fission yeast.

○今田 一姫[1,2]、中村 太郎[2] ([1]鈴鹿高専、[2]大阪市大院理)
○Kazuki IMADA[1,2], Taro NAKAMURA[2] ([1]Suzuka College, [2]Osaka City Univ.)

分裂酵母の Ypt2（哺乳類 Rab8、出芽酵母 Sec4 オルソログ）は、ゴルジ以降の膜小胞の分泌経路に必要な Rab small GTPase である。減数分裂時、Ypt2 はスピンドル極体（SPB：哺乳類の中心体にあたる構造）に局在し、将来の胞子の細胞膜を新生するのに働く。この局在は減数分裂特異的な SPB 構成因子 Spo13 に依存的である。Spo13 は Ypt2 の GDP/GTP 交換因子（GEF）として機能し、Ypt2 を活性化するが、GEF 活性は非常に低い。そこで GEF 活性を失くした *spo13-FA* 変異株で Ypt2 の局在を観察した。その結果、*spo13* 欠失変異株では Ypt2 の SPB 局在は全く見られなかったが、*spo13-FA* 変異株では約 1/4 の細胞で SPB に局在しており、Spo13 の GEF 活性が必須でない可能性が示唆された。そこで、本当に Ypt2 の GDP/GTP 交換反応が Ypt2 の局在に必要なのかを確かめるため、Ypt2 の GDP 結合型変異体 Ypt2-S18V の局在を調べたところ、Ypt2-S18V は約半数の細胞で SPB に局在した。この Ypt2-S18V は Spo13 に結合するが、Spo13-FA は SPB 局在するものの出芽酵母 Sec4 とのアフィニティが大幅に低下することが知られている。したがって、Ypt2 の SPB 局在には Spo13-Ypt2 間のアフィニティが重要であり、GDP/GTP 交換反応は必須ではないと考えられる。

fission yeast, Rab small GTPase, GDP/GTP exchange factor

発表責任者：今田一姫（imada@chem.suzuka-ct.ac.jp）

講演番号：2A03p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A03 会場

ERAD に必要なチオレドキシン由来の還元力伝達を担う小胞体膜タンパク質の解析
Analysis of ER membrane proteins involved in electron transfer from cytosolic thioredoxin in the ER-associated degradation.
○田中 絵里子[1]、寶関 淳[2,3]、阪井 康能[1,3] ([1]京大院農、[2]京都学園大・バイオ環境、[3]京大・生理化学)
○Eriko TANAKA[1], Jun HOSEKI[2,3], Yasuyoshi SAKAI[1,3] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Fac. Bioenviron., Kyoto Gakuen Univ., [3]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【背景】
小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質の合成及び成熟の場である。小胞体膜に結合したリボソームで翻訳された新生ポリペプチド鎖は、糖鎖修飾やジスルフィド結合などの翻訳後修飾を受けながらフォールディングされる。小胞体でフォールディングされるタンパク質は厳格に品質管理されており、正しく折りたたまれたものだけがゴルジ体から分泌経路に送られ、そうでないものは小胞体内に留められ、リフォールディングされる。しかし、どうしても正しくフォールディングできないものはサイトゾルへ逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。この一連の経路は小胞体関連分解(ERAD: ER-associated degradation)と呼ばれている。小胞体はジスルフィド結合形成に適した酸化的環境にあるが、ERAD ではミスフォールドタンパク質のジスルフィド開裂を促進することが必要であり、その還元力の供給源として還元型グルタチオンが必須であると考えられてきた。我々はこれまでに *S. cerevisiae* における ERAD の還元力の供給源としてサイトゾルに局在するチオレドキシン(Trx2)が寄与しうることを明らかにしつつあるが、Trx2 の還元力を小胞体内腔へ伝達する機序はいまだ不明である。
【方法・結果】
本研究ではサイトゾルに局在する Trx2 の還元力伝達に関与する小胞体膜タンパク質の探索を行った。チオレドキシンの活性部位である CXXC モチーフ中の 2 つめの Cys を Ala に置換した CA 変異体はジスルフィド結合を介して結合する基質との結合を安定化することで基質を捕捉する。本研究では、Trx2-FLAG CA 変異体株とコントロールとして CXXC モチーフ中の両 Cys を Ala に置換した AA 変異体株のマイクロソーム画分をそれぞれ分画し、界面活性剤で可溶化した後の FLAG beads による免疫沈降産物の LC-MS/MS 解析を実施した。その結果、Trx2-FLAG CA 変異体と特異的に結合するタンパク質として 364 個を同定した。そのうち、膜貫通領域を持ち、サイトゾル側に保存されたシステイン残基を有するものを絞り込むことで、サイトゾル Trx2 とジスルフィド結合を介して結合し、Trx2 の還元力をサイトゾルから小胞体内腔に供給しうる 9 個の候補小胞体膜タンパク質を同定した。現在、この候補遺伝子の破壊株を作製し、小胞体に異常タンパク質を発現させた際の生育やその分解に与える影響を解析している。

endoplasmic reticulum, protein quality control, redox

講演番号：2A03p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A03 会場

分泌タンパク質アグマチナーゼの分裂酵母における生理的役割の解析
Analysis of physiological role of secretory protein agmatinase in fission yeast
石田 麻里絵、兼丸 加也、青木 克幸、田淵 光昭、○田中 直孝（香川大農・応用生物）
Naotaka TANAKA, Kaya KANEMARU, Katsuyuki AOKI, Mitsuaki TABUCHI, ○Naotaka TANAKA (Kagawa Univ.)

アグマチナーゼの基質であるアグマチンは、アルギニンデカルボキシラーゼによってアルギニンから生合成されるポリカチオン性アミンである。アグマチンは、哺乳類では主に脳内で生産され、神経伝達物質として機能すると予測されているが、近年になって研究が進み始めたため、真核微生物における生理的機能や作用メカニズム等は未解明である。

アグマチンの生合成経路としては、現在、アルギニンから合成される経路が分かっており、真核生物ではその後アグマチンはアグマチナーゼによってポリアミンであるプトレシン、スペルミジン、スペルミンへと生合成される。また、ポリアミンの生合成経路にはアルギニンからオルニチンを介した経路も存在しており、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）ではアグマチン経由、オルニチン経由の両ポリアミン生合成経路を有していることが分かっている。分裂酵母にはアグマチナーゼをコードする遺伝子が 3 種類存在すると予測されており、それぞれ *agm1*$^{+}$、*agm2*$^{+}$、*agm3*$^{+}$と命名した。各 Agm には、いずれもシグナルペプチドが存在することが予測サイトで明らかになっている。本研究では *agm*$^{+}$を欠損させることによる分裂酵母でのアグマチンの生理的機能の解明、及び各 Agm の諸性質の解析を行うことを目的とした。

まず、各 *agm* 破壊株の表現型を観察するため、オルニチン、アグマチン、プトレシンの 3 つを様々な濃度で組み合わせたところ、25 mM アグマチン、1 mM プトレシンとなるように同時添加した培地では、*agm3*Δ 株の生育が著しく遅延することが分かった。そこで、*agm3*Δ 株に内在性プロモーター下の *agm3*$^{+}$をプラスミドで導入したところ、相補して生育したことから、各 Agm のうち Agm3 がこの条件下での生育に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*agm3*Δ 株に EGFP タグを付加した *agm3*$^{+}$をプラスミドで導入し、同条件下で生育させ、Agm3 の局在を観察したところ、液胞等のオルガネラで蛍光が観察された。従って、Agm3 はこれらの細胞内オルガネラで機能している可能性が高いと考えられる。

また、推定活性中心 E363 を E363Q に変異させた *agm3*、シグナルペプチドを欠損させた *agm3* をそれぞれプラスミドで導入した *agm3*Δ 株は、上記の培地で生育しなかったことより、この条件下での生育には、アグマチナーゼ活性と分泌経路を経由した Agm3 の正しい局在が重要であるということが示唆された。

fission yeast, polyamine, agmatinase

発表責任者：田中直孝（ntanaka@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2A03p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A03 会場

マグネシウムが *Lactobacillus* 属の細胞壁テイコ酸に与える影響
Effect of magnesium on wall teichoic acid in *Lactobacillus*
○宮下 誉、田中 尚人、藤田 信之、志波 優（東京農業大学）
○Homare MIYASHITA, Naoto TANAKA, Nobuyuki FUJITA, Yuh SHIWA (Tokyo University of Agriculture)

【目的】 一部のグラム陽性細菌は細胞壁テイコ酸(WTA) と呼ばれる酸性多糖を持つ。WTA はペプチドグリカンに共有結合しており糖アルコールとリン酸を１つのユニットとしてこれが繰り返しつながったポリマーで、その構造には多様性がある。WTA の主な機能には環境中の金属吸着があり、Mg を選択的に吸着するという報告があることから、菌体の Mg 恒常性に役立っていると考えられる [1)]。また、一般的に WTA は種内であればその構造が統一されているが、乳酸菌においては WTA の多様性が大きく種間における WTA の有無だけではなく株間においても構造に多様性があることが報告されている [2)]。しかし、WTA の構造の多様性と機能における関連性は明らかにされておらず、知見は少ない。そこで、本研究は WTA の Mg 選択性とその構造の多様性の関連性を検討することにより、WTA について新たな知見を得ることを目的とした。
【方法】 WTA の構造がそれぞれ異なる *Lactobacillus plantarum* 6 株を供試菌株とした。改変田村・角田合成培地を基本培地として Mg 濃度を通常(×1)、制限(Mg 無添加)、過剰(×10)とした培地で培養することで Mg 濃度が生育に及ぼす影響を確認した。各 Mg 濃度の培地で菌体を大量培養した後、WTA の簡易抽出を行った。得られた WTA について ^{1}H-NMR を行うことにより各条件で得られた WTA について構造の比較を行った。
【結果】 制限条件では、最終菌体量が減少する傾向が見られた。過剰条件においては生育が早くなるものの最終菌体量が減少する傾向が見られた。抽出できた WTA の量は株間によって差はあるものの乾燥細胞壁画分 1g 当たり通常条件で 10~20mg 、制限条件で 15mg~35mg、過剰条件で 15mg~25mg となり、すべての株で制限条件において WTA 量が最も多くなった。すべての株で各条件において糖アルコールとそこに修飾しているグルコースについて変化が生じていないことが確認された。生育試験と WTA の抽出の結果から乳酸菌は細胞壁上の WTA 量を上昇させることにより環境中の Mg 濃度の変化に対応していると考えられる。また、WTA は環境中の Mg 濃度が変化しても主鎖の基本構造に変化が生じないことが分かった。現在、WTA に吸着されている金属量を測定することで、Mg 選択性と構造の関係性について検討している。

1)Kieth J.Thomas Ⅲ,Charles V.Rice. (2015) Biochimica et Biophysica Acta 1848, 1981-1987
2)Satoru Tomita. et al. (2012) Microbiology 158, 2712–2723

magnesium, wall teichoic acid, *Lactobacillus*

講演番号：2A03p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A03 会場

低温菌における機能性多価不飽和脂肪酸の細胞内局在の可視化

Subcellular localization of a functional polyunsaturated fatty acid in a cold-adapted bacterium

○川本 純、徳永 智久、渡辺 文太、小川 拓哉、栗原 達夫（京大・化研）
○ Jun KAWAMOTO, Tomohisa TOKUNAGA, Bunta WATANABE, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Insti., for Chem., Res., Kyoto Univ.)

[目的] エイコサペンタエン酸 (EPA) は 20 の炭素と 5 つの非共役二重結合からなる長鎖多価不飽和脂肪酸である。EPA は、脳溢血や動脈硬化といったヒトの血管系疾患の発病リスクを低下させる生理活性脂質であり、積極的な摂取が推奨されている。一方で、EPA の生理機能発現機構の分子基盤、特に、EPA の代謝経路や細胞内局在の詳細は未だ明らかでない。本研究では、EPA の生理機能解析に応用可能な汎用性の高い解析用ツールとして、EPA のメチル末端に炭素-炭素三重結合（エチニル基）を導入したω-エチニル型 EPA (eEPA) を開発した。eEPA は、生理条件下でアジド基を有する種々の標識試薬との特異的な環化付加反応（クリックケミストリー）により、化学修飾することが可能であり、eEPA の可視化や相互作用するタンパク質の探索が可能になると期待される。本研究では、EPA の細胞内局在性の可視化を目的とし、eEPA 存在下で培養した南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を、アジド基を有する蛍光色素とのクリックケミストリーに供した。

[方法] eEPA 含有培地で、4 °C で *S. livingstonensis* Ac10 を培養した。eEPA 存在下での生育を解析すると同時に、培養後の菌体からリン脂質を抽出し、ESI-MS で解析した。培養後の菌体を化学固定し、透過処理後に銅イオン存在下で Azide Alexa-Fluor 488 とのクリックケミストリーに供した。蛍光標識後の試料は、超解像蛍光顕微鏡 (Nikon 社製 N-SIM 顕微鏡、および ライカ社製 STED 顕微鏡) を用いて、EPA の細胞内局在を解析した。対照に、本菌の生体膜リン脂質の主成分であるパルミトレイン酸を標的に、eEPA 同様、ω-エチニル型パルミトレイン酸 (ePAL) を合成し、本菌に添加した。

[結果と考察] 本菌は、低温誘導的に EPA を生体膜リン脂質のアシル鎖として生産する。EPA 生合成遺伝子を破壊することで獲得した EPA 欠損株は低温での増殖能が低下するが、天然型 EPA 存在下で培養することで、EPA 欠損株の低温での生育障害は抑制される。eEPA の添加は、天然型 EPA と同様に EPA 欠損株の生育能の低下を抑制し、本菌のリン脂質のアシル鎖成分に変換されていたことから、eEPA は天然型 EPA と同様に機能することが示された。eEPA 存在下で培養した後の本菌をクリックケミストリーに供し、eEPA を蛍光標識した結果、eEPA に由来する蛍光シグナルは細胞膜上に不均一に分布していた。一方で、ePAL 由来の蛍光シグナルは細胞膜上に均一に分布していたいことから、本菌において EPA は他の脂肪酸とは異なる分布で存在することが示唆された。

Eicosapentaenoic acid, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Click chemistry

講演番号：2A03p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A03 会場

低温菌 *Shewanella* sp. HM13 の膜小胞輸送による選択的タンパク質分泌に関与する遺伝子の探索
Exploring genes involved in the selective protein secretion via the vesiculation of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella* sp. HM13

○釜阪 紘平[1]、チェン チェン[1]、横山 文秋[1]、川本 純[1]、今井 友也[2]、小川 拓哉[1]、栗原 達夫[1] ([1]京都大学化学研究所、[2]京都大学生存圏研究所)
○Kouhei KAMASAKA[1], Chen CHEN[1], Fumiaki YOKOYAMA[1], Jun KAWAMOTO[1], Tomoya IMAI[2], Takuya OGAWA[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

アジの腸管より単離された *Shewanella* sp. HM13 は、タンパク質分泌能に秀でた低温適応性のグラム陰性細菌である。本菌は、機能未知タンパク質 P49 をほぼ単一の積み荷タンパク質とする菌体外膜小胞 (Outer membrane vesicle, OMV) を生産することから、本菌を宿主とした低温での膜タンパク質分泌生産系の開発が期待されている。本研究では、本菌の膜小胞輸送を介した選択的なタンパク質分泌生産機構の解明を目的に、P49 の OMV への移行や OMV 生産に関与する遺伝子群を探索した。本菌の全ゲノム解析の結果、OMV の積み荷タンパク質である P49 の遺伝子は、II 型タンパク質輸送装置のホモログ、リポ多糖の合成および輸送系、ニトロレダクターゼ、その他機能未知タンパク質をコードする遺伝子群から成る遺伝子クラスターに存在することが明らかとなった。本菌の OMV を介した P49 分泌生産における P49 周辺遺伝子の機能を解析するために、各遺伝子の破壊株を作製し、OMV 画分の SDS-PAGE によって、OMV に輸送される P49 量を解析した。同時に、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた OMV の形態観察、および脂溶性の蛍光色素 FM4-64 を用い、OMV の生産性を評価した。これまでに P49 遺伝子の上流に存在する II 型分泌装置様のタンパク質輸送装置を構成すると予想される線毛タンパク質のホモログ遺伝子 (HM3357)、足場タンパク質のホモログ遺伝子 (HM3358)、ATPase のホモログ遺伝子 (HM3359)、および P49 遺伝子の下流に存在するニトロレダクターゼホモログ遺伝子（HM3342）、Wzx-フリッパーゼホモログ遺伝子 (HM3343)、機能未知の細胞膜合成関連タンパク質遺伝子(HM3344 および HM3345) の破壊株の獲得に成功した。まず、各遺伝子破壊株の OMV 画分を TEM 観察に供した結果、いずれの場合も野生株と同粒径の OMV が確認された。OMV 生産量は、野生株と比べ多くの破壊株で減少が見られ、HM3357 破壊株でのみ増加が見られた。したがって、これらの遺伝子を破壊しても OMV は生産されるが、その生産量は影響を受けることがわかった。次に OMV 画分における P49 を SDS-PAGE で解析した結果、これらの遺伝子変異株の OMV 画分中の P49 量は野生株と比較して顕著に低下していた。一方で、各遺伝子変異株の培養上清から OMV を除去した画分（Post-Membrane vesicle Fraction, PMF）における P49 量が野生株に比べて顕著に増加していたことから、P49 の OMV への移行における、これらの遺伝子群の関与が示唆された。

Shewanella, membrane vesicle, protein secretion

発表責任者：釜阪紘平（kama.kinoko144@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A03p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A03 会場

低温菌 *Shewanella* sp. HM13 におけるベシクル分泌関連タンパク質の探索

Investigation of Proteins Related to Vesiculation in a Psychrotrophic Bacterium, *Shewanella* sp. HM13

○横山 文秋[1]、川本 純[1]、陳 晨[1]、今井 友也[2]、栗原 達夫[1] ([1]京大・化研、[2]京大・生存研)
○Fumiaki YOKOYAMA[1], Jun KAWAMOTO[1], Chen CHEN[1], Tomoya IMAI[2], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

これまでに多くの細菌についてベシクル（膜小胞）の分泌が報告されている。ベシクルは脂質膜から成る 20-250 nm の球体で、タンパク質や核酸などを内包している。細菌の生存や宿主への病原性にベシクルの関与が示唆されており、その生理機能に注目が集まっている。一方で、ベシクルに内包される様々な生体分子を活かしたワクチンやドラッグデリバリーシステムの開発も進められている。このようにベシクル分泌は今後の展開が期待される微生物機能である。しかし基礎・応用研究の発展に必須となるベシクル分泌機構について、その詳細はあきらかにされていない。

当研究室でアジ腸管より単離した低温菌 *Shewanella* sp. HM13 は、大腸菌と比較して脂質量換算で約 9 倍のベシクル分泌能を有しており、ベシクル分泌機構を解析するためのモデル細菌として有用と言える。さらに、そのベシクル中には SDS-PAGE によりほぼ単一のバンドとして高純度・高濃度のタンパク質（P49）が検出される。

P49 をコードする遺伝子の上流には II 型分泌装置の構成成分のホモログをコードする遺伝子（*pulD*）が存在する。この遺伝子を欠損させた株（Δ*pulD*）では、野生株と比較してベシクル分泌量に大きな変化は見られないが、ベシクル中に内包されていたタンパク質 P49 は培養上清中のベシクル外の画分に検出される。このことから、PulD が構成する分泌装置によってベシクル中に内包される P49 などの成分ではなく、その他の成分がベシクル分泌に関与すると考えた。

そこで、ベシクルの膜の裏打ちに関与するタンパク質や、細胞膜からのベシクル切り出しに関与するタンパク質を想定し、それらのベシクル分泌に関わるタンパク質の探索を行った。Δ*pulD* の細胞膜成分とベシクル中に含まれるタンパク質を二次元電気泳動によって分離し、ペプチドマスフィンガープリンティングを用いて同定を行った。ベシクル中に同定されたタンパク質には、メチル基受容走化性タンパク質、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、ピルビン酸酸化酵素、グルコース-1-リン酸アデニリルトランスフェラーゼ、カルボキシ-S-アデノシル-L-メチオニン 合成酵素、シデロフォア合成酵素、ジンクフィンガータンパク質、メカノセンシティブイオンチャネルなどが含まれていた。

現在、同定されたタンパク質の中から、PSORT-b によって膜局在性が推定されたものを中心にいくつかの欠損株の作製に成功している。今後、欠損株のベシクル分泌能の解析を進め、ベシクル分泌の低下した欠損株について、欠損させた遺伝子がコードするタンパク質がベシクル分泌に関与する可能性を検討していく予定である。

vesicle, psychrophile, *Shewanella*

発表責任者：横山 文秋（yokoyama@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A03p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A03 会場

Serratia marcescens ヘム捕捉タンパク質 HasA 分泌の分子機構の解明
Molecular mechanism of secretion of an extracellular heme-binding protein, HasA, from Serratia marcescens

○森川 瑠美[1]、小出（吉田） 静代[2]、山下 純平[2]、高木 大地[2]、辻 明彦[2,3]、大森 謙司[4]、湯浅 恵造[2,3] ([1]徳島大工、[2]徳島大院先端技術、[3]徳島大生物資源、[4]名大院創薬)
○Rumi Morikawa[1], Shizuyo Koide-Yoshida[2], Junpei Yamashita[2], Daichi Takagi[2], Akihiko Tsuji[2,3], Kenji Omori[4], Keizo Yuasa[2,3] ([1]Fac. Eng., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ, [3]Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

大腸菌や *Serratia marcescens* などのグラム陰性菌には数種のタンパク質分泌機構が備わっており、その 1 つである type 1 secretion system (T1SS)は、ATP-binding cassette (ABC) protein、membrane fusion protein、outer membrane protein の 3 つのコンポーネントから構成されている。*S. marcescens* では、2 つの T1SS (Lip system (LipB-LipC-LipD)、Has system (HasD-HasE-HasF))により、異なるタンパク質 LipA、HasA がそれぞれ選択的に分泌生産されている。ABC protein である LipB や HasD が分泌タンパク質の基質選択に関与することが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。これまでに LipB を 5 つの領域(domain 1-5)に分け、それぞれの領域を相当する HasD に置換したモザイク ABC protein を作製し、domain 2 のみを HasD に置換したモザイク ABC protein である ABC_{LHLLL} が LipC-LipD との組み合わせによって HasA を分泌したことから、この領域が HasA の認識・分泌に関わることを明らかにしてきた。本研究では、HasA の認識に関わる更なる詳細な領域の特定を試みた。ABC_{LHLLL} の HasD 領域を LipB アミノ酸配列に部分置換し、HasA の分泌を調べた結果、LipB ^{258}LGGW の 4 アミノ酸を相当する HasD ^{248}CGAL に置換した $LipB_{CGAL}$ 変異体が HasA を分泌することが明らかとなった。これに対して、HasA は大腸菌において HasD-HasE-TolC によって高分泌されるが、HasD ^{248}CGAL を LipB ^{258}LGGW に置換した $HasD_{LGGW}$ 変異体では HasA の分泌がほとんど全く認められなかった。これらの結果より、HasD の 4 アミノ酸 ^{248}CGAL が HasA の認識・分泌に関わることが明らかとなった。

一方、T1SS により分泌されるタンパク質は通常の分泌タンパク質と異なり、N 末端シグナルペプチドを持たず、C 末端側に分泌に関わる配列を有していることが報告されている。そこで、次に HasA の C 末端分泌シグナル配列を特定するために、HasA 188 アミノ酸の C 末端から 2～3 アミノ酸ずつ欠失させた変異体を作製し、Has system による分泌を検討した。C 末端 4 アミノ酸欠失変異体 $HasA_{1\text{-}184}$ は分泌されたのに対して、7 アミノ酸欠失変異体 $HasA_{1\text{-}181}$ は菌体内での発現は認められたが、その分泌は検出されなかった。さらに、HasA の C 末端側の ^{175}VGV 配列に着目し、Val を Ala に置換した変異体($HasA_{AGA}$、$HasA_{AGV}$、$HasA_{VGA}$)を作製し、ABC_{LHLLL}-LipC-LipD による分泌を調べた。いずれの変異体も菌体内での発現は認められたが、分泌は認められず、これらの配列が HasA の分泌に関わっていることが示された。現在、更なる詳細な解析を行っており、併せて報告したい。

HasA, type 1 secretion system, Serratia marcescens

発表責任者：湯浅恵造（k.yuasa@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：2A03p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A03 会場

細菌の有機塩素系殺虫剤資化に必須な ABC トランスポーターホモログの機能解析
Functions of ABC transporter homologue essential for utilization of organochlorine pesticide in bacteria
○佐藤 緋奈子、中鉢 千尋、佐藤 優花里、矢野 大和、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大・院生命科）
○Hinako SATO, Chihiro CHUBACHI, Yukari SATO, Hirokazu YANO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane（γ-HCH）は人体に有害であり、環境中での残留性が高いことから環境汚染物質として問題となっている。当研究室では、γ-HCH を唯一の炭素源として生育可能な *Sphingobium japonicum* UT26 株のγ-HCH 代謝系の全貌を解明し、UT26 株のγ-HCH 資化能には、γ-HCH 代謝に直接関わる酵素遺伝子に加えて、輸送基質が未知の ABC トランスポーターホモログ遺伝子群 *linKLMN* が必須であることを示した（Endo et al. *J. Bacteriology* 189: 3712-3720, 2007)。さらに、*linKLMN* 領域を薬剤耐性遺伝子で置換した *linKLMN* 欠損株では外膜成分が培地中に漏出し、疎水性物質の膜透過性が上昇したことから、LinKLMN は何らかの外膜成分の輸送を介して外膜の integrity に関与していると推測された。本研究では、LinKLMN の機能解明を目的として、新たに *linKLMN* 完全欠失株と相補株を作製してその表現型を観察すると共に、ペリプラズムに局在し、輸送基質と直接結合することが予想されるコンポーネントである LinM の大腸菌での発現・精製を行った。
【方法・結果および考察】UT26 株の *linKLMN* 領域をマーカーレスで完全に取り除いた *linKLMN* 完全欠失株を作製した。さらに、本株に構成的発現プロモーター支配下に *linKLMN* を配したプラスミドを導入して相補株を作製した。*linKLMN* 欠失株は、1/3LB 完全培地を用いた場合には、液体培地でも寒天固体培地でも野生型株に比べて顕著な生育の差は観察されなかった。これに対して、無機塩寒天培地では、グルコースを唯一の炭素源とした場合には生育の差は見られなかったが、γ-HCH を唯一の炭素源とした場合には *linKLMN* 欠失株は生育せず、本生育阻害は相補株で緩和された。興味深いことに、コハク酸を唯一の炭素源とした場合には、*linKLMN* 欠失株は野生型株より良好な生育を示し、*linKLMN* 欠失株ではコハク酸の取り込み効率が上昇していると示唆された。次に、損傷した細胞膜を透過し核を染色する SYTOX Green を用いた蛍光顕微鏡観察を行った結果、*linKLMN* 欠失株は野生型株と比較して顕著に染色頻度が高かった。以上の結果は、*linKLMN* 欠失株の細胞膜の物質透過性が野生型株に比べ上昇していることを示唆する。一方、LinM は脂質輸送に関与する mammalian cell entry (MCE) ドメインを有することから、LinKLMN は脂質輸送を担う ABC トランスポーターである可能性が考えられた。シグナル配列を除き、His タグを付与した LinM を大腸菌で発現・精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーで解析したところ、LinM は他の MCE タンパク質と同じく多量体（10 量体）を形成することが判明した。

ABC transporter, organochlorine pesticide, cell membrane

発表責任者：佐藤　緋奈子（h.sato@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A03p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A03 会場

微生物相互作用を制御しうる MV 生産機構の解析

Prophage may alter cell-to-cell communication through membrane vesicle formation

○安田 まり奈[1]、豊福 雅典[2]、森永 花菜[1]、尾花 望[2]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大院・生命環境科学研究科、[2]筑波大・生命環境系)
○Marina Yasuda[1], Masanori Toyofuku[2], Kana Morinaga[1], Nozomu Obana[2], Nobuhiko Nomura[2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ.)

細菌は、自身の膜からメンブレンベシクル（MV）を生産する。この MV には核酸・シグナル物質が内包されており、これら物質の運搬体として働く。本研究で用いている *Paracoccus denitrificans* の生産する MV には自身が生産・利用するシグナル物質が高濃度で含まれていることが明らかとなったことから、本菌の MV と微生物間相互作用には密接な関わりがあることが示唆された（Toyofuku *et al.* 2017. ISME）。しかしながら、*P. denitrificans* の MV 生産機構についてはまったく知られておらず、本菌における微生物相互作用を理解するためにも、その MV の生産機構について詳細な解析を行うことは非常に重要であると考えられる。

近年、我々は *Pseudomonas aeruginosa* において新奇 MV 生産機構を発見した（Turnbull, Toyofuku *et al.* 2016. *Nat Commun.*）。この MV 生産機構はストレスによって誘導され、本来、菌体内で生産されたファージを環境に放出するための溶菌に関わる遺伝子である *lys*、*hol* が関与する。これらの遺伝子は本研究では、*P. denitrificans* を用いて、異種細菌においても *P. aeruginosa* と同様な MV 生産機構があることを検証し、その詳細を明らかにすることを目的とした。

DNA ダメージを与える薬剤 MMC を用いて、*P. denitrificans* におけるストレス条件下での MV 生産能を解析したところ、MMC の添加量に応じて MV の生産誘導が見られた。このことから、*P. denitrificans* においても *P. aeruginosa* で見られたストレス誘導性の MV 生産経路が存在することが考えられた。そこで、ストレス条件下で生産された MV に含まれる DNA のシークエンスを行ったところ、プロファージ遺伝子が豊富に含まれていることが分かった。また、豊富に含まれていた遺伝子の中には、推定 *lys* 遺伝子が存在していた。この推定 *lys* 遺伝子の欠損株を作製し、ストレス条件下の MV 生産能を評価したところ、野生株で見られたストレスによる MV 生産誘導が見られなくなった。またストレス応答因子である *recA* は、SOS 応答を介して多くの遺伝子の発現を制御していることが知られている。この *recA* 欠損株を用いて、同様の実験を行ったところ、*recA* 欠損株においてもストレスによる MV 生産誘導が見られなくなった。以上より、*P. denitrificans* において、ストレス条件下での MV 生産にはプロファージ遺伝子である *lys* が関与することが明らかとなり、本 MV 生産機構は SOS 応答を介して制御されていることが示唆された。

本菌の生産する MV にはシグナル物質が豊富に含まれているため、プロファージ遺伝子が MV を介して細菌の微生物相互作用に影響を与えるということが考えられる。

Membrane vesicle, Prophage, Cell-to-cell communication

講演番号：2A03p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A03 会場

環境中に存在するメンブレンベシクルの解析

Membrane vesicles isolated from natural settings

○鬼澤 里奈[1]、豊福 雅典[2]、森永 花菜[1]、尾花 望[2]、野村 暢彦[2]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系)
○Rina ONIZAWA[1], Masanori TOYOFUKU[2], Kana MORINAGA[1], Nozomu OBANA[2], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

細菌は環境中に広く存在しており、その多くがメンブレンベシクル（ＭＶ）と呼ばれる膜小胞を産生していることが明らかとなっている。MV は主に細胞膜から成る直径 20～400 nm の球状構造をとり、タンパク質や DNA など細菌由来成分を多く含むことが報告されている。また、MV は様々な生理学的機能を有することが知られており、細菌間および細菌-宿主間相互作用において重要な因子であると考えられている。

海洋中に MV が豊富に存在する（S. J. Biller, *et al.*, *Science*, 2014）など、MV は環境中にも存在し、MV の微生物生態への関与が示唆された。一方で、これまでの MV 研究は単離株を用いた限られた条件下におけるものがほとんどであった。そのため、実際の環境中での MV の存在およびその機能に関してはいまだ多くが未解明である。そこで、本研究では実環境中の MV に着目し、環境中での MV の存在および MV 供与菌の探索を行った。

環境試料として活性汚泥および筑波大学内の池から採取した水を用いた。各試料から超遠心を用いて粒子画分を回収し、透過型電子顕微鏡によって微細構造の観察を行った。その結果、これまでに報告されている MV の形態と合致する MV 様粒子が各粒子画分において観察された。さらに、環境試料および粒子画分に由来する DNA を次世代シーケンサーを用いて解析したところ、環境試料と粒子画分の 16S rRNA 配列に門レベルで違いが見られた。この違いは、粒子画分にて MV を含む粒子由来の DNA が濃縮されたことを示唆し、本手法が MV 供与菌の探索に有効であることを支持する。

活性汚泥および池の水の双方にて MV 様粒子が観察されたことから、MV は環境中に広く存在することが示唆された。先行研究にて MV が栄養供給源となり得ることなどが報告されており、MV が物質循環をはじめとした微生物生態に関与している可能性がある。さらに、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析により、MV 供与菌を同定し得る可能性を示した。今後、他環境における MV 解析も進めていく予定である。

membrane vesicle, complex microorganisms, natural settings

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A03p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A03 会場

バイオフィルムにおける膜小胞分泌誘発とカルジオリピン局在化

Increased membrane vesicle secretion and localization of cardiolipin in biofilm

○塩田 拓也[1]、田代 陽介[1]、新谷 政己[1]、二又 裕之[1,2]、金原 和秀[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○TAKUYA SHIOTA[1], YOSUKE TASHIRO[1], MASAKI SHINTANI[1], HIROYUKI FUTAMATA[1,2], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka. Univ., [2]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka. Univ.)

【背景】

多くの細菌は、自身の膜表層からリポソーム様構造体である膜小胞（Membrane vesicles: MVs）を分泌する。MVs は直径 20~200 nm、リン脂質二重層で構成されており、自身の DNA やタンパク質等を含有して他の細菌に送達するため、細胞間情報伝達の媒体として機能している。一方、細菌は細胞単体の浮遊状態や固体表面で形成されるバイオフィルム（BF）状態など様々な形態で生息しており、各々の状態で遺伝子発現ならびに生理学的性質が異なる。一般的に、BF 状態での MV 分泌量は浮遊状態に比べて高く、MVs は BF における細胞外マトリクスの構成成分としても機能している。しかし、BF 中で MV 分泌が誘発される要因の全貌は明らかとなっていない。病原性細菌における BF 形成は慢性感染の要因の一つであり、BF 状態における MVs の生理的機能ならびに分泌機構の理解が求められている。そこで本研究では、日和見感染菌である緑膿菌をモデル微生物として用い、BF 中における MV 分泌誘発機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株を LB 培地で、振盪（浮遊状態）あるいは静置（BF を形成する状態）で培養した。細胞と MVs からリン脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分離・検出・定量化を行ったところ、どちらにおいても振盪培養より静置培養の方がカルジオリピン（CL）の割合が増加した。静置培養では振盪培養に比べて MV 分泌量が著しく増加したことから、BF 内において CL が MV 分泌に関与している可能性が考えられた。そこで CL に特異的に結合する Nonyl acridine orange（NAO）を用いて、細胞膜中の CL の分布を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、振盪培養では CL が細胞膜上に均一に分布するのに対し、静置培養では不均一に局在する現象が確認された。特に静置培養条件では、MV 分泌部位での CL 局在が観察された。2 分子のフォスファチジルグリセロールが結合した CL は 4 つの脂肪酸を持つ特徴的な構造であり、大腸菌では細胞膜の極や中央隔離などの湾曲部に存在する。そのため、緑膿菌においても MV 分泌の際における膜湾曲部位に CL が局在すると考えられた。現在 CL 合成遺伝子欠損株を用いて、BF における MV 分泌と CL 局在化の関係について解析中である。

Membrane vesicle, Biofilm, Cardiolipin

講演番号：2A03p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A03 会場

細菌の膜小胞取り込みを促進する膜間隙異常
Periplasmic aberration promotes bacterial uptake of membrane vesicles
○高木 航太郎[1]、長谷川 雄将[1]、二又 裕之[1,2]、田代 陽介[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Kotaro TAKAKI[1], Yusuke HASEGAWA[1], Hiroyuki FUTAMATA[1,2], Yosuke TASHIRO[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka. Univ., [2]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka. Univ.)

【緒言】
微生物が細胞外に分泌する膜小胞 (Membrane vesicles: MVs) は、DNA やタンパク質など微生物由来の物質を高濃度に含有しており、周囲の微生物細胞に効率良く情報伝達する媒体として機能している。これまでに MVs を介した遺伝子水平伝播や抗生物質送達の例が報告されており、革新的な遺伝子導入技術への応用やドラッグデリバリーシステム (DDS) への展開が期待されている。一方、MV の分泌機構に関する知見は蓄積されつつあるものの、細菌の MV 取り込み機構に関しては未知な点が多く、そのメカニズム解明が上記応用に向けてのボトルネックとなっている。そこで本研究では、微生物細胞の MV 取り込みに関与する因子の同定とその機構解明を目的とした。
【方法】
先行研究において MV 高生産菌として見出されたグラム陰性細菌 *Buttiauxella agrestis* CUETM77-167 を本研究のモデル微生物として用い、CUETM77-167 株の細胞表層の構成に関与する遺伝子の欠損株を作製した。野生株の培養液から MVs を抽出し、脂質二重膜染色色素 FM4-64 で標識した MVs を野生株ならびに変異株と反応させた。洗浄後の受容菌の蛍光強度を MV 取り込み能として評価した。また、野生株ならびに変異株の細胞形態、MV 取り込みを位相差ならびに蛍光顕微鏡で観察した。
【結果】
ペリプラズムに局在するタンパク質 TolB の遺伝子欠損株を受容菌とした場合、野生株に比べて約 2 倍の MV 取り込みが示された。また細胞形態の顕微鏡観察を行ったところ、*tolB* 欠損株では細胞分裂に異常が現れ、野生株とは異なり連鎖状の形態が観察された。TolB はペリプラズム領域で内膜と外膜を架橋するタンパク質として知られている。そのため、*tolB* 欠損株ではペリプラズム領域に空隙が生じ、外膜に MVs を取り込むための弛緩性が生まれたと考えられた。

Membrane vesicles, TolB, Membrane fusion

発表責任者：田代陽介（tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A03p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A03 会場

グリシンによる大腸菌メンブレンベシクル産生の増大とその特性解析

Analysis on *E. coli* outer membrane vesicles induced by glycine

○平山 悟、中尾 龍馬（感染研・細菌第一）
○Satoru HIRAYAMA, Ryoma NAKAO (Dept. Bac. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【目的】グラム陰性細菌は、細胞外へメンブレンベシクル(outer membrane vesicle)と呼ばれるナノサイズの小胞を放出する。ベシクルは細胞膜由来のリン脂質や膜タンパク質、LPS 等で構成されるほか、核酸や酵素等の様々な物質を含有するため、多面的な機能を有し、新規ワクチン抗原のような応用展開も期待されている。大腸菌において、このベシクル産生がグリシン存在下で培養することにより顕著に増大することを見出した。グリシンは甘味を呈するとともに細菌の生育を抑制する性質があるため食品添加物として用いられるが、このグリシンの生育抑制作用は、ペプチドグリカンに含まれるアラニンと競合し、グリシンが代わりに組込まれることに起因する(Hammes *et al.*, *J. Bacteriol.* 1973)。本研究では、プロバイオティクスとして用いられている *E. coli* Nissle 1917 株を対象に、グリシンが誘導するベシクル産生や、そのベシクルの特性を解析することを目的とした。

【方法】大腸菌のベシクルは、培養上清をフィルトレーション後、超遠心分離することにより調製した。調製したベシクルは Bradford 法によるタンパク質定量や FM4-64 を用いた脂質定量を行い、TEM(透過型電子顕微鏡)による観察を行った。大腸菌の遺伝子破壊は Datsenko and Wanner の方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2000)に従った。

【結果】ベシクル画分には鞭毛が多量に混在するため、鞭毛を形成する遺伝子カスケードの上流にある *flhD* を欠損させることで鞭毛非発現株を作製し、より純度の高いベシクル調製を可能にした。この Nissle 1917 Δ*flhD* 株の培養時に 1%のグリシンを添加することにより、超遠心後に得られたベシクル画分のペレットが顕著に大きくなったことが目視でも判別できた。グリシン添加区のベシクル画分は、未添加区に比較してタンパク質量がおよそ 10 倍、脂質量が数十倍またはそれ以上に増大した。TEM による観察を行うと、未添加区では直径数十 nm のベシクルが多く見られるが、グリシン添加区では 100 nm を超えるものも散見され、全体的にサイズが増大していた。グリシン添加区でもベシクルは球形を維持しており、明瞭な細胞のデブリスは認められなかった。これらのことから、大腸菌のベシクル産生はグリシンによって顕著に誘導されることが見出され、ベシクルの応用展開に有効であることが期待された。誘導したベシクルの特性についても解析を進めているため、併せて報告したい。

outer membrane vesicle, glycine

講演番号：2A04a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A04 会場

キナクリンはヒト肺がん腫 A549 細胞において TNF-αおよび Fas リガンドに対する感受性を増強する

Quinacrine enhances the sensitivity to TNF-α and the Fas ligand in human adenocarcinoma A549 cells.

○原田 美鈴、森元 今日子、近藤 哲也、平松 令子、翁 侑史、向 亮、松田 伊世、片岡 孝夫（京工繊大応生）
○Misuzu HARADA, Kyoko MORIMOTO, Tetsuya KONDO, Reiko HIRAMATSU, Yuji OKINA, Ryo MUKO, Iyo MATSUDA, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech)

【目的】Nuclear factor κB（NF-κB）は炎症応答や免疫応答、細胞の生存に関わる様々な遺伝子の発現制御に重要な転写因子であり、炎症性疾患やがんに対する治療薬の標的とされている。アミノアクリジン誘導体の一つであるキナクリンは、様々な生物活性を持ち、NF-κB シグナル伝達経路に作用することが報告されている。しかし、NF-κB シグナル伝達経路の活性化におけるキナクリンの作用機序は十分に理解されていない。本研究では、炎症性サイトカイン TNF-α による細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）の発現誘導や NF-κB シグナル伝達経路、並びに TNF-α や Fas リガンドに対する感受性におけるキナクリンの作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞をキナクリンで前処理し、TNF-α または IL-1α の存在下で培養した。細胞表面の ICAM-1 の発現量を Cell ELISA 法により測定し、定量 PCR 法を用いて、*ICAM-1* 遺伝子の転写に対するキナクリンの作用を調べた。NF-κB サブユニット p65 の核移行および cellular FLICE-inhibitory protein（c-FLIP）と Mcl-1 の発現をウェスタンブロッティングにより検討した。クロマチン免疫沈降法および定量 PCR 法を利用し、*ICAM-1* 遺伝子プロモーターにおける p65 の結合を評価した。キナクリンで処理した A549 細胞を TNF-α または Fas リガンドの存在下で培養し、細胞生存率を MTT 法によって測定した。
【結果と考察】A549 細胞を TNF-α または IL-1α で処理すると、ICAM-1 の発現が誘導されたが、その発現はキナクリンによって減少した。キナクリンは ICAM-1 の mRNA の発現を阻害し、NF-κB 応答性のルシフェラーゼ活性も減少させた。したがって、キナクリンが NF-κB の活性化による ICAM-1 遺伝子の発現誘導に作用することが示唆された。キナクリンは TNF-α による p65 のリン酸化および核移行を阻害しなかった。一方、キナクリンは A549 細胞において、TNF-α が誘導する *ICAM-1* 遺伝子プロモーター領域への p65 の結合を阻害することが明らかとなった。さらに、キナクリンは TNF-α や Fas リガンドに対する感受性を増強し、抗アポトーシス作用を持つ c-FLIP と Mcl-1 の発現を減少させた。これらの結果から、キナクリンは TNF-α によって誘導される NF-κB シグナル伝達経路の活性化を阻害し、NF-κB の標的遺伝子である ICAM-1、c-FLIP、Mcl-1 の発現を制御することによって炎症応答や細胞の生存に作用することが示された。

NF-κB, TNF-α, the Fas ligand

講演番号：2A04a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A04 会場

細胞接着因子 ICAM-1 の細胞内輸送に対するアシアチン酸の作用機序の解明

Molecular mechanism of asiatic acid on the intercellular transport of the cell adhesion molecule ICAM-1

○馬場 康輔、平松 令子、片岡 孝夫（京都工芸繊維大学応用生物）
○Kousuke BABA, Reiko HIRAMATSU, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】五環性トリテルペノイド類は多くの植物に含まれる化合物で、抗がん作用や抗炎症作用などの様々な生物活性をもつことが報告されている。我々は、五環性トリテルペノイド類が細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞内輸送に与える作用を報告してきた[1,2]。その研究成果の一つとして、ウルソール酸 (ursolic acid)がゴルジ体の断片化を誘導すること、並びに ICAM-1 の細胞内輸送を阻害することによって、ICAM-1 の細胞表面への発現を抑制することを明らかにした[1]。本研究では、ウルソール酸類縁体の一つであるアシアチン酸 (asiatic acid)の糖鎖修飾や細胞内輸送に対する作用機序を解明することを目的とした。

【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を、五環性トリテルペノイドの存在下で 1 時間前培養した後、炎症性サイトカイン interleukin-1α (IL-1α)で刺激し、ICAM-1 の発現を誘導した。細胞表面の ICAM-1 発現量に対する影響を cell-ELISA 法、細胞生存率に対する影響を MTT 法、細胞内の ICAM-1 の低分子量化や糖鎖修飾に対する影響をウェスタンブロット法、細胞内輸送における ICAM-1 の局在性に対する影響を免疫染色法で解析した。

【結果と考察】cell-ELISA 法と MTT 法より、細胞生存率にほとんど影響がない濃度において、ウルソール酸は細胞表面への ICAM-1 の発現を阻害したのに対し、アシアチン酸は細胞表面への ICAM-1 の発現に対する阻害作用が弱かった。一方、ウルソール酸とアシアチン酸は ICAM-1 の低分子量化を誘導し、いずれも Endo H 感受性である高マンノース型糖鎖を誘導した。そこで、細胞表面の ICAM-1 発現の経時変化を検討したところ、アシアチン酸が細胞表面への ICAM-1 の発現を遅延させることを見出した。さらに、ICAM-1 と小胞体マーカーであるカルネキシンを免疫染色したところ、アシアチン酸処理によって ICAM-1 が小胞体に局在する細胞が増加していることが観察された。以上の結果より、アシアチン酸は小胞体に作用すること、ICAM-1 の低分子量化や ICAM-1 の糖鎖修飾に作用すること、ICAM-1 の小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を遅延させることが明らかとなった。

【参考文献】

1. Mitsuda, S. et al., FEBS OPEN Bio, 4, 229-239 (2014)
2. Hiramatsu, R. et al., Eur. J. Pharmacol., 767, 126-134 (2015)

asiatic acid, intercellular adhesion molecule-1, endoplasmic reticulum

講演番号：2A04a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A04 会場

TNF-αにより誘導される NF-κB シグナル伝達経路に対する 4-hydroxypanduratin A と isopanduratin A の作用機序の解析

Mechanism of 4-hydroxypansuratin A and isopanduratin A on NF-κB signaling pathway by TNF-α

○谷垣 里穂[1]、NGUYEN Thi Thanh Mai[2]、NGUYEN Trung Nhan[2]、DO Van Nhat Truong[2]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学・応生、[2]ベトナム国家大学ホーチミン市校)
○Riho TANIGAKI[1], Thi Thanh Mai NGUYEN[2], Trung Nhan NGUYEN[2], Van Nhat Truong DO[2], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept.Appl.Biol.,Kyoto Inst.Tech., [2]Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City)

【目的】転写因子 nuclear factor κB (NF-κB)は炎症反応や抗アポトーシス反応に関わる遺伝子の転写を調節している。定常状態ではダイマーとして細胞質に存在するが、tumor necrosis factor α (TNF-α)のような炎症性サイトカイン刺激などによって活性化し、核内へ移行する。我々は NF-κB 活性化によって発現誘導される細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を阻害する物質として、4-hydroxypanduratin A (4-HPA)と isopanduratin A (IPA)を見出した。4-HPA と IPA はベトナムで採取された植物 *Boesenbergia pandurata* の地下茎のメタノール抽出物から単離した小分子化合物であり、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞に対する抗がん活性を有する[1)]。本研究では、TNF-αで誘導される NF-κB 活性化のシグナル伝達経路に対する 4-HPA と IPA の作用機序の解明を目的とした。

【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を 4-HPA もしくは IPA で 1 時間処理した後、TNF-αで刺激し、cell-ELISA 法及び MTT 法によって ICAM-1 発現量と細胞生存率を測定した。NF-κB 応答性ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより、NF-κB 活性化に対する影響を調べた。NF-κB サブユニット p65 と核を染色した後、共焦点顕微鏡で観察することによって、p65 が細胞質もしくは核に存在する細胞数を測定し、NF-κB の核移行に対する影響を検討した。

【結果と考察】4-HPA と IPA はいずれも 25 μM 以上の濃度で ICAM-1 発現を阻害することを見出した。A549 細胞に対する 4-HPA と IPA の細胞生存率への影響を調べたところ、4-HPA は 50 μM までは生存率に影響がなかったが、IPA は 50 μM では生存率を大きく減少させた。以上の結果から、4-HPA と IPA は A549 細胞の生存率に影響しない濃度において ICAM-1 の発現を阻害することが明らかになった。4-HPA と IPA は NF-κB 応答性のルシフェラーゼ活性も阻害した。そこで NF-κB シグナル伝達経路における p65 の核移行に対する影響を調べたところ、4-HPA と IPA は TNF-α刺激後の p65 の核移行を阻害することが観察された。以上の結果から 4-HPA 及び IPA は TNF-α刺激による NF-κB 活性化を阻害し、その作用点は p65 の核移行もしくはその上流のシグナル伝達経路であることが示唆された。

【参考文献】

1) Nguyen N,T. et al. J.Nat.Prod., 80,141-148 (2017)

4-hydroxypanduratin A, isopanduratin A, NF-κB signaling pathway

講演番号：2A04a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A04 会場

NMN の PC12 細胞におけるミトコンドリア機能亢進を介した酸化ストレスからの細胞保護効果
Protective effects of NMN against oxidative stress induced PC12 cell death via mitochondrial enhancement

○伊藤 章悟、長井 薫 (甲子園大学)
○Shogo ITO, Kaoru NAGAI (Koshien Univ.)

酸化ストレスは神経系において、パーキンソン病、アルツハイマー病などの様々な神経変性疾患に関与していることが知られている。一方、近年、NAD+の前駆体である NMN(ニコチンアミドモノヌクレオチド)が、様々な動物モデルや細胞レベルで、老化関連疾患等の酸化ストレスが関与する疾患を改善することが報告されている。このことは、NMN が酸化ストレスに抑制的に働くことで、疾患の改善に働く可能性を示唆している。神経系の細胞においても NMN が酸化ストレスを抑制することを示唆する報告がなされているが、その作用機序は明らかになっていない。本研究では、NMN が NAD+の前駆体であることに着目し、NMN が細胞に取り込まれることで老化や寿命の重要な調節因子である NAD+依存性の脱アセチル化酵素サーチュインを活性化し、これが酸化ストレスで障害を受けるミトコンドリアの機能を改善することで酸化ストレスを抑制すると仮説を立てた。まず、PC12 細胞を神経細胞モデルとし、6 ヒドロキシドーパミン及び過酸化水素による酸化ストレスに対して NMN が保護効果を示すか否かを解析したところ、有意な細胞保護効果が観察された。この保護効果は Sirt1 阻害剤である Sirtinol を同時投与したところ失われたことから、サーチュイン依存性であることが示唆された。ミトコンドリアに対する作用として、NMN 処理細胞内のミトコンドリア量をミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 染色後のサイトメトリー解析と、ミトコンドリア ATP 合成酵素 β サブユニットおよびミトコンドリアに局在する SOD2 の発現量の解析を行ったところ、顕著なミトコンドリア量の増加とミトコンドリアタンパク質の発現上昇が観察された。さらに、ミトコンドリア増殖因子として知られる PGC-1α の発現も NMN 処理により増加した。これらミトコンドリアに対する作用は Sirtinol 投与によって抑制されたことからサーチュイン依存性であると考えられる。本研究の結果は、NMN がサーチュイン活性化を介したミトコンドリア機能亢進作用により酸化ストレスから PC12 細胞、さらには神経細胞を保護する作用があることを強く示唆している。

nicotinamide mononucleotide, mitochondria, oxidative stress

講演番号：2A04a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A04 会場

ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価
Evaluation and analysis of genetically modified *Lactobacillus casei* expressing *Yersinia* Invasin using C2BBe1 cells.
○武田 昌之[1]、桝田 和彌[3]、梶川 揚申[2]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生科、[3]昭和女生活科)
○Masayuki TAKEDA[1], Kazuya MASUDA[3], Akinobu KAJIKAWA[2], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Food. Scie. Nutr., Showa Women's Univ.)

【目的】近年、乳酸菌を抗原運搬体として利用する経口粘膜ワクチンの開発が試みられており、その免疫誘導効率を向上させることが課題となっている。腸管免疫システムを介した特異的な粘膜免疫の誘導においては、パイエル板が主要な免疫誘導組織として機能している。このことから、経口粘膜ワクチンにおいてパイエル板での取り込みを促進することは、免疫誘導効率を改善する方法の一つとして有効であると考えられる。当研究室では、パイエル板から侵入することが報告されている *Yersinia pseudotuberculosis* の侵入因子である Invasin に着目し、これを遺伝子組換えにより乳酸菌に表層提示させた株が先行研究により作出された。しかし、その機能評価は未だ不十分である。従って本研究では、この遺伝子組換え乳酸菌をヒト腸管上皮細胞モデルにて評価することを目的とした。
【方法・結果】*Lactobacillus casei* IGM393 を遺伝子組換えした *Yersinia* 由来 Invasin 発現株(LCI497)と非発現（LCN）を供試菌とした。ヒト腸管上皮細胞モデルである C2BBe1 細胞 1.0×10^5cells に対して MOI（Multiplicity Of Infection）=100 となるよう供試菌を添加した。その後、供試菌における C2BBe1 細胞への接着菌数および侵入菌数を CFU により算出した結果、接着・侵入どちらにおいても LCI497 において LCN と比較して有意な増加が確認された。さらに、MOI=100 で供試菌を添加した細胞から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行ったところ、LCI497 を添加した細胞では、炎症応答に関与する遺伝子や、細胞接着分子に関わる遺伝子において LCN と比較して発現量に顕著な差が確認された。
【考察】 *Yersinia* 由来の侵入因子である Invasin を発現させた乳酸菌(LCI497)において、ヒト腸管上皮細胞モデル(C2BBe1)への 接着および、侵入能力の向上が確認された。また、LCI497 を C2BBe1 に添加した場合における炎症・免疫反応に関わる遺伝子発現の増加は、細胞内に取り込まれる菌数が LCN よりも多いことと一致する結果となった。細胞接着分子であるフィブロネクチンおよび、テトラスパニン関連遺伝子（*FNDC9,TSPAN11*）は、Invasin と反応することが報告されている α5β1-integrin 受容体と関連性の高い遺伝子であるため、LCI497 を添加した細胞において顕著な差が見られたものと思われる。現在、トランスクリプトーム解析の結果から発現量に差が見られた遺伝子に関して qPCR による再評価を行うと共に、LCN および LCI497 が細胞内に取り込まれる菌数を等しくした場合における遺伝子発現量の変化を評価している。

Invasin, Lactic acid bacteria, Transcriptome analysis

講演番号：2A04a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A04 会場

His-Asp リン酸リレー情報伝達機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節
Control of mitochondrial function through His-Asp phosphorelay signal transduction in *Aspergillus nidulans*
○金丸 京子、平川 拓実、木村 真、小林 哲夫（名大院生命農）
○Kyoko KANAMARU, Takumi HIRAKAWA, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ)

【目的】
真核生物にとってミトコンドリアは、ATP やヘム、脂肪酸などの合成や代謝に関わる重要なオルガネラである。そのため、生育環境の変化によるミトコンドリアの機能低下は最終的に生育停止や細胞死を引き起こす。一方、わが国の醗酵醸造産業において、糸状菌の生育を継続、維持することが生産性の向上に重要だが、ミトコンドリア機能がもたらす有効性についてほとんど検討されていない。近年、われわれは、環境応答システムを利用した糸状菌の生育促進を目的に、関連制御因子の網羅的解析を行い、その過程で、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構のヒスチジンキナーゼ HysA がミトコンドリアの機能維持に重要であることを見出した。本研究では HysA 欠損株の機能変化を解析し、環境変化に応答したミトコンドリア機能調節が糸状菌の正常な生育に重要であることを明らかにする。
【方法・結果】
これまでにわれわれは、Mito Tracker Red プローブを用いたミトコンドリア膜電位レベルの観察や ATP 量の測定を行い、HysA 欠損株ではミトコンドリア機能が低下していることを示した。ミトコンドリアの機能低下と活性酸素種（ROS）発生の関連性について理解するために、ミトコンドリアで発生した ROS を検出する Mito Sox Red プローブを用いて顕微鏡観察したところ、欠損株の菌糸、分生子柄で ROS の発生を確認した。電子伝達系は多くのタンパク質因子で構成されているが、それらの発現量の変化は電子の正常な流れに影響する。HysA 欠損株では、複合体 I の Alternative factors である AifA, NdeA の発現量が上昇することを定量 PCR 解析で明らかにした。すなわち、ユビキノンへの過剰な電子の伝達が ROS 発生を引き起こしたと考える。HysA が菌体内のどこで機能するかについて理解するために、HysA-GFP 融合タンパク質の発現株を利用した顕微鏡観察や HysA の高発現株を利用した細胞分画を行ったところ、HysA はミトコンドリアに局在することが明らかになった。HysA の自己リン酸化調節については、大腸菌で発現させた HysA タンパク質を用いて解析したところ、酸化還元条件での多量体形成がリン酸可能に影響することが明らかになった。以上の結果を踏まえ、His-Asp リン酸リレー機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節の重要性について考察する。

mitochondria, His-Asp phosphorelay signal transduction, *Aspergillus nidulans*

発表責任者：金丸京子（kanamaru@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A04a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A04 会場

細胞性粘菌の種間を超えて保存されているポリケタイド合成酵素の発生過程における機能進化
Evolution of functions of a polyketide synthase conserved throughout cellular slime molds in development

○成田 隆明[1]、Pauline Schaap[2] ([1]上智大理工、[2]ダンディー大)
○Takaaki Narita[1], Pauline Schaap[2] ([1]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ., [2]Sch. of Life Sci., Univ. of Dundee)

【目的】土壌微生物である細胞性粘菌は、そのゲノム中に数多くのポリケタイド合成酵素（PKS)遺伝子を持つことが知られている。モデル生物として広く用いられている *Dictyostelium discoideum* が有する PKS 遺伝子の数は 40 個以上にも及ぶ。近年、*D. discoideum* 以外の細胞性粘菌種のゲノム情報の解析が進むにつれ、細胞性粘菌各種が持つ PKS はそれぞれ独自に進化を遂げてきており、種間を超えて保存されている PKS はわずか 3 種類のみであることが明らかとなった。

SteelyB は I 型と III 型が融合したハイブリッド型 PKS であり、細胞性粘菌の種間を超えて保存されている PKS の一つである。*D. discoideum* において、SteelyB は DIF-1 (Differentiation inducing factor-1)と呼ばれるポリケタイドを合成しており、この DIF-1 は *D. discoideum* の柄細胞の一部を分化誘導するシグナル分子として機能している。しかし、他の細胞性粘菌種における SteelyB の機能は全く分かっておらず、他種においても SteelyB の産物は柄細胞分化に関与してるのか、そしてその産物は DIF-1 であるのかは不明である。そこで本研究では、*D. discoideum* の近縁種であり、*D. discoideum* とは明らかに形態の異なる子実体を形成する *Polysphondylium violaceum* に着目し、この種における SteelyB の機能解析を行った。

【方法】GenBank に登録されているゲノム情報を基に、*P. violaceum* における SteelyB 相同遺伝子の探索及びその遺伝子破壊を行い、得られた遺伝子破壊株の表現型の解析を行なった。

【結果】*P. violaceum* の SteelyB 遺伝子破壊株（*Pv-stlB* 株)は、野生株とは明らかに異なる子実体を形成した。*Pv-stlB* 株の子実体は野生株に比べて柄の根元が太くなり、側枝をほとんど形成しないことが分かった。*P. violaceum* は発生中期の slug と呼ばれる時期から柄を形成し始めるが、*Pv-stlB* 株は slug 期における stalk tube の形成に欠損が見られること、さらに *Pv-stlB* 株は野生株に比べてより多くの細胞が柄細胞に分化してしまうことが示唆された。これらの *Pv-stlB* 株の表現型の欠損は DIF-1 によりほぼ回復したことから、*D. discoideum* と同様、*P. violaceum* においても SteelyB は DIF-1 を合成していることが強く示唆された。

以上より、*D. discoideum* の *stlB* 株、すなわち DIF-1 欠損株では柄細胞の一部が欠失するのに対し、その近縁種である *P. violaceum* の *stlB* 株ではより多くの柄細胞が形成されてしまうことが明らかとなった。つまり、*D. discoideum* の場合とは異なり、*P. violaceum* において SteelyB の産物は柄細胞分化を誘導するのではなく、逆に柄細胞分化を抑制していると考えられる。

Polyketide, Cell differentiation, Cellular slime mold

講演番号：2A04a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A04 会場

キチンオリゴ糖は CERK1 を介して気孔閉口を誘導する

Chitin oligosaccharide induces stomatal closure mediated by CERK1

○叶 文秀[1,2,3]、新屋 友規[3]、木下 俊則[2]、賀来 華江[4]、渋谷 直人[4]、村田 芳行[3] ([1]（独）日本学術振興会外国人特別研究員、[2]名古屋大学、[3]岡山大学、[4]明治大学)
○ Wenxiu Ye[1,2,3], Tomonori Shinya[3], Toshinori Kinoshita[2], Hanae Kaku[4], Naoto Shibuya[4], Yoshiyuki Murata[3] ([1]JSPS International Research Fellows, [2]Nagoya Univ., [3]Okayama Univ., [4]Meiji Univ.)

気孔は一組の孔辺細胞で囲まれた穴で、多くの微生物の侵入経路となる。植物は microbe-associated molecular patterns（MAMPs）という微生物に広く保存される物質を認識し、気孔閉口を誘導することで微生物の侵入を阻止できる。キチンは真菌の細胞壁成分であり、植物のキチナーゼによるその分解産物キチンオリゴ糖（CTOS）が MAMP として植物に認識される。一方で、病原真菌は侵入段階でキチンをキトサンに、CTOS をキトサンオリゴ糖（CSOS）に変換する能力を有することが知られている。CTOS は気孔閉口を誘導するが、そのメカニズムはほとんど解明されていない。一方で、CSOS は気孔閉口を誘導するかどうかが未解明のままである。本研究はシロイヌナズナにおいて CTOS シグナル伝達の詳細を調べた。その結果、CTOS は気孔閉口を誘導するとともに、孔辺細胞において原形質膜カルシウム透過性チャネルを活性化し、細胞質カルシウム濃度の上昇を誘導し、S 型アニオンチャネルを活性化した。これらの応答は CTOS 信号伝達のマスター因子である CERK1 依存的であった。さらなる実験で CTOS による気孔閉口に必要とされるいくつかの因子を同定した。一方で、CSOS は気孔開度に顕著な影響を与えなかった。本研究はシロイヌナズナ孔辺細胞における CTOS シグナル伝達の基盤を構築し、孔辺細胞レベルでの植物と病原真菌の戦いのメカニズムを提案する。

chitin, chitosan, guard cell

発表責任者：叶文秀（yewenxiu@msn.com）

講演番号：2A04a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A04 会場

葉面に棲息する *Methylobacterium* 属細菌における KaiC タンパク質の環境適応バランサー機能
KaiC proteins in the phyllosphere microorganism *Methylobacterium* sp. function to balance environmental cues

○吉田 裕介[1]、井口 博之[2]、藤澤 健斗[1]、由里本 博也[1]、小山 時隆[3]、阪井 康能[1]([1]京大院農、[2]京都学園大バイオ環境、[3]京大院理)
○Yusuke YOSHIDA[1], Hiroyuki IGUCHI[2], Kento FUJISAWA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Tokitaka OYAMA[3], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Faculty of Bioenvironmental Sci., Kyoto Gakuen Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】葉面などの植物地上部は、光・温度など日周変動する環境からの刺激の影響を大きく受ける環境の一つであり、このような環境に棲息する葉面微生物は、これらの環境刺激に対する適応能力を持つと考えられる。葉面微生物の優占種であり、植物生長促進効果をもつことが知られている *Methylobacterium* 属細菌は、植物から放出されるメタノールを炭素源・エネルギー源として利用するが、植物葉面のメタノール濃度もまた日周変動することを見出している。我々はこれまでに、*Methylobacterium extorquens* AM1 において、シアノバクテリアにおける概日時計タンパク質である KaiC のホモログ（KaiC1, KaiC2）が植物への定着に関与すること、KaiC の機能発現にはリン酸化制御が重要な役割を果たしていることを報告した[1,2]。本研究では、UV と温度という２種の環境刺激を受けた時の *M. extorquens* AM1 KaiC タンパク質の機能解析を行った。

【方法・結果】*M. extorquens* AM1 の２つの KaiC タンパク質をコードする遺伝子、*kaiC1* および *kaiC2* の遺伝子破壊株、及び *kaiC1/kaiC2* 二重遺伝子破壊株について、様々な培養温度下（24～32℃）における UV ストレス応答について調べた。野生株では、培養温度の上昇に伴って UV 耐性が上昇した（Temperature-Dependent UV Resistance, TDR）。*kaiC1* 破壊株では、いずれの培養温度でも UV 暴露時の生存率が野生株よりも低下したが、*kaiC2* 破壊株では、28℃以下では UV 暴露時の生存率が野生株よりも上昇し、32℃では野生株と同等の生存率を示した。また *kaiC1/kaiC2* 二重遺伝子破壊株は、*kaiC1* および *kaiC2* の遺伝子破壊株の中間的な表現型を示した。これらの結果から、KaiC1 は TDR における正の制御因子、KaiC2 は負の制御因子として機能していることが示唆された。さらに、KaiC タンパク質の発現量やリン酸化状態について調べたところ、TDR は KaiC1 の発現量と KaiC2 のリン酸化レベルにより制御されており、KaiC タンパク質が複合環境刺激に応答するためのバランサーとして機能することが示唆された。

1) 井口ら、日本農芸化学会 2014 年度大会、3A09p19
2) 藤澤ら、日本農芸化学会 2015 年度大会、2B21p14

Methylobacterium extorquens, KaiC, phosphorylation

発表責任者：吉田裕介（yoshida8@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A04a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A04 会場

イネいもち病菌における推定カルシウムチャネル構成因子 Ehs1 の機能解析
Functional analysis of a putative Ca^{2+} channel subunit Ehs1 in *Pyricularia oryzae*
○林 平、平岡 輪子、成川 恵、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大院理工・応生）
○ Taira HAYASHI, Wako HIRAOKA, Megumi NARUKAWA, Takayuki ARAZOE, Takashi KAMAKURA (TUS)

［背景］
イネいもち病菌はイネに感染して甚大な被害を及ぼす糸状菌である。宿主表面に接着した胞子が形成した付着器と呼ばれる器官から侵入糸を宿主組織内に挿し込むようにして侵入し、侵入糸から宿主細胞内に侵入菌糸を伸長させて感染が進行する。本菌の発芽管伸長時および付着器形成時において細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇することが知られている。また、Ca^{2+}シグナリング関連因子の阻害剤存在下では付着器形成率及び病原性が低下したとの報告がある。これらから、本菌の感染メカニズムには Ca^{2+}が重要な働きをしていることが考えられる。そこで、機能未解明である推定 Ca^{2+}チャネル構成因子 Ehs1 (echinocandin hypersensitive 1) に注目した。Ehs1 は出芽酵母で発見された伸展活性化 Ca^{2+}チャネル構成因子 Mid1 (mating pheromone-induced death 1) のオルソログである。Mid1 はチャネルポアを構成するサブユニットである Cch1 と相互作用して細胞膜および小胞体膜上に Mid1/Cch1 チャネルを形成し、様々なストレス条件下において活性化して細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させることが知られている。また、Mid1 オルソログの欠損によって病原性が低下することがいくつかの真菌において報告されている。これらより、イネいもち病菌における Ehs1 は病原性に関わっている可能性が考えられる。
[方法]
RACE 法を用いて mRNA の配列を決定した。2 回相同組換えによって取得した *ehs1* 欠損株と野生型株における表現型の比較を通して、Ehs1 の機能解析を行った。
[結果・考察]
まず、*EHS1* の mRNA の配列を決定し、*MID1* と相同性の高い遺伝子として *EHS1* が発現していることが確認された。*ehs1* 欠損株と野生型株の付着器形成率において有意な差は見られなかったが、Ca^{2+}キレート剤である EGTA を添加した人工培地上で *ehs1* 欠損株の栄養菌糸伸長速度が低下した。また、このときの *ehs1* 欠損株の栄養菌糸の分枝数が野生型株のものと比較して増加する傾向が観察された。Ehs1 は低 Ca^{2+}濃度条件下における生育に重要な役割を果たしていることが考えられ、高親和性の Ca^{2+}チャネル構成因子として機能している可能性が示唆された。さらに、植物体内への侵入能やストレス応答への寄与などの Ehs1 の更なる機能解析や、GFP を用いた Ehs1 の局在解析を試みている。

Pyricularia oryzae, Ehs1, Calcium

講演番号：2A04a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A04 会場

緑膿菌の DNA 含有膜小胞の産生に関与する遺伝子に関する研究
A gene involved in the production of DNA containing membrane vesicle in *Pseudomonas aeruginosa*
○高野 恵、大桃 惇也、志村 洋一郎、福島 淳（秋田県立大学・生物資源科学部・微生物機能）
○Megumi Takano, Junya Omomo, Yoichiro Shimura, Jun Fukushima (Akita prefectural Univ.)

【背景・目的】
緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）を含むグラム陰性菌は膜小胞（Membrane Vesicle : MV）と呼ばれる粒子を産生することが知られている。MV は直径 50～220 nm の二重膜の球状の粒子であり、リポ多糖、外膜タンパク質、リン脂質などから構成されている。2015 年に緑膿菌 MV には外膜小胞（Outer Membrane Vesicle : OMV）と内膜-外膜小胞（Inner-Outer MV : I-OMV）の二種類あることが報告された［1］。I-OMV は細胞が自己溶菌する際に生成し、DNA を含んでいることも示唆されている。そこで、本研究では I-OMV の産生について着目し、ペプチドグリカン（PG）を分解する酵素 AmiB［2］ の MV 産生への関与について調べることを目的とした。

【方法】
緑膿菌で二重交差法により、*amiB* 遺伝子の破壊株を作製した。ここで得た緑膿菌で MV 産生量、MV に含まれる DNA 量について調べた。それぞれの菌の培養上清を超遠心機で分画して MV を分離し、さらに Optiprep(コスモ・バイオ社)を用いた密度勾配遠心により MV を精製した。含有 DNA 量は同じ画分について SYBR Green Ⅰ で、MV 量は OD220 nm により定量した。MV に含まれているタンパク質を検出するため、SDS-PAGE を行った。

【結果と考察】
緑膿菌の *amiB* 遺伝子の破壊実験をして得た株と野生株との MV を含む超遠心沈殿画分の OD220 nm の値は、野生株が破壊実験株の 4.1 倍の値となった。さらに、DNA 量を測定したところ、野生株の単位 OD220 nm 当たりの DNA 量は破壊株の 5.39 倍になっていた。Optiprep による分画においても同様の結果が得られた。このことから *amiB* 遺伝子の破壊実験を行ったことにより、DNA を含む MV の産生量が減少すると考えられた。以上より *amiB* は緑膿菌の溶菌を引き起こし、I-OMV の産生に関与している可能性があると考えられた。

[1] C. Perez-çruz et al. (2015) PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.01168
[2] E. M. Scheurwater et al. (2007) Protein Expression and Purification 56: 128-137

outer membrane vesicle, Inner-outer membrane vesicle, Autolysis

講演番号：2A04a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A04 会場

大腸菌のアラニン要求変異株に由来する薬剤耐性菌の出現頻度に及ぼす影響評価
Development of antibiotic resistant mutants from the alanine auxotroph of *Escherichia coli*
○橋本 美優[1]、金 世怜[2]、安藤 太助[1]、磯貝 恵美子[1]、米山 裕[1]([1]東北大農、[2]産総研)
○ Miyu HASHIMOTO[1], Seryoung KIMU[2], Tasuke ANDOU[1], Emiko ISOGAI[1], Hiroshi YONEYAMA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)

【目的】我々は大腸菌の L-アラニン(Ala)要求性変異株を遺伝学的な手法で取得しその性質を解析する過程で、本菌を Ala を含有しない最少寒天培地で培養すると、自然突然変異株の出現頻度より高頻度で Ala 非要求性サプレッサー変異株が出現することを発見した。この現象は大腸菌が Ala 飢餓ストレスを感知し、何らかの細胞内カスケードを経て突然変異が惹起されたと解釈できる。一方、緑膿菌は抗生物質に暴露されると多剤排出ポンプを高発現することによって耐性化し、この耐性化頻度が自然突然変異より高いという興味ある現象が発見されている。そして、このポンプの高発現による耐性頻度の上昇が大腸菌野生株で再現できることを我々は見いだしている。そこで本研究では、これらの異なった環境ストレス（アミノ酸飢餓と抗生物質暴露）に応答する細胞内カスケードにクロストークがあるのか否か検証するための第一歩として、薬剤排出ポンプの発現誘導をモニターすることができるレポータープラスミド(pT8)を、Ala 要求変異株に導入した形質転換体の耐性化頻度に及ぼすクロラムフェニコール(CP)の影響を評価した。
【方法】薬剤排出ポンプとその上流域をもつレポータープラスミド pT8 を導入した大腸菌野生株は、CP 存在下で培養すると、ポンプ上流に位置する遺伝子に特異的な変異が誘発され、その結果としてポンプのアクチベーターが活性化されて高頻度に CP に耐性となることが知られている。そこで、この pT8 を Ala 要求変異株 HYE032 に導入して得た形質転換体 HYE032(pT8)を、CP (0.78-50 μg/ml)存在下 2.5 hr 培養し、CP (12.5 および 25 μg/ml)を含む L 寒天培地に塗布後 2 日培養して出現した CP 耐性クローンの数を計測し、トータルコロニー数に対する耐性菌出現頻度を算出した。
【結果と考察】CP 処理をしない時の HYE032(pT8)の CP (25 μg/ml)耐性菌出現頻度は、約 1.6×10^{-5} であった。一方、CP 処理(0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 および 50 μg/ml)した場合の耐性菌出現頻度は、各々3.6×10^{-5}, 7.7×10^{-5}, 4.7×10^{-5}, 3.8×10^{-5}, 4.3×10^{-5}および1.6×10^{-5}であり、CP 濃度が 1.56 μg/ml まで耐性菌出現頻度は上昇し、それ以上の CP 処理では低下した。この結果は、CP ストレスを感知した細胞が薬剤排出ポンプ上流の特異的な変異を誘発した結果耐性能を獲得したと解釈することができ、Ala 要求変異株においても野生株と同様の現象が起こることが検証できた。また、このストレス応答には至適な CP 濃度の条件が存在することが示唆された。今後、Ala 飢餓ストレス条件下で CP 耐性菌出現頻度に及ぼす影響を評価する予定である。

E. coli, drug resistance, mutation

発表責任者：米山裕（hiroshi.yoneyama.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A04a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A04 会場

サルモネラ菌における情報伝達クロスレギュレーションの体系的解析
Systematic analysis of cross-regulatory profiles in two-component signal transduction systems in *Salmonella enterica*
○加藤 明宣（近大農）
○Akinori KATO (Kindai Univ.)

感染性微生物の多剤耐性化が進み、それらの多様な適応応答機構の解明が重要性を増している。細菌の病原性調節や薬剤耐性遺伝子発現調節等に関わる二成分制御系(TCS)は、環境シグナルを認識するセンサー(HK)とそれを細胞応答に変換するレギュレーター(RR)からなる基本的な情報伝達ユニットより構成される。近年、ある TCS が別の TCS に働きかけ、発現を制御するクロスレギュレーションの新しい機構が明らかとなってきた。本研究では、サルモネラ菌の野生株と HK/RR 欠損株と RR 高発現系において、それぞれの TCS に直接的に調節されるプロモーターをルシフェラーゼ発光量変化として検出し、他の TCS が与える間接的な影響を見出すことで、新たなクロスレギュレーションの体系的解析を目指している。

これまでに One-step 法にて 33 種の HK/RR 欠損株（Cm^R）が作成された。これらの菌株と、各 TCS に直接調節される代表的なプロモーターを有するルシフェラーゼ・レポーター・プラスミド系列の pLUX1097-promoters（Gm^R）を保持する接合可能大腸菌を LB 培地で接合し、Cm、Gm を含む LB 寒天培地上で選択した。これらを 96 穴プレート内の LB 培地にて培養し、ルシフェラーゼ発光量変化を測定した。一方、HK/RR 欠損株（Cm^R）に固有の pCF430-RR を導入し、これを RR 高発現系とした。接合可能大腸菌から pLUX1097-promoters 系列（Gm^R）を LB 寒天培地上で接合することで、RR の高発現によりペア HK 非依存的に検出されるクロスレギュレーションについても評価が可能である。この接合により得られた菌株について、96 穴プレート内で L-アラビノースを含む LB 液体培地にて培養後、ルシフェラーゼ発光量の誘導率として解析した。新たに CsgD→CpxAR 又は CsgD→BaeRS 間、CsgD→CreBC 間、4 種の TCS (DpiAB、FimZ、HydGH、PmrAB、RstAB)→CsgD 間で正の、CpxRA→YehUT 間で負のクロスレギュレーション等の存在が示唆された。

regulatory network, signal transduction, genome

発表責任者：加藤 明宣（kato_a@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2A04a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A04 会場

細菌の熱耐性における Toxin-Antitoxin システムの機能
The role of Toxin-Antitoxin system in bacterial heat tolerance
○益田 時光[1]、坂本 英莉花[2]、本城 賢一[1]、宮本 敬久[1] ([1]九大院農院、[2]九大農)
○Yoshimitsu MASUDA[1], Erika SAKAMOTO[2], Ken-ichi HONJOH[1], Takahisa MIYAMOTO[1] ([1]Kyushu Univ. Graduate School, Agr., [2]Kyushu Univ., Agr.)

食中毒細菌を制御する上で、加熱処理は最も広く用いられる殺菌手法といえるが、加熱が不十分、又は食品中においてムラがあるなどして、熱耐性の高い菌が損傷菌などの形で生き残り、食中毒を引き起こすおそれがある。一方、Toxin-Antitoxin（TA）システムは Persister 形成およびバイオフィルム形成などを制御するシステムであり、毒性の toxin と、その毒性を抑制する antitoxin により構成されている。通常は複合体を形成することで toxin の毒性を抑制しているが、様々な環境ストレスにさらされると、Lon などのプロテアーゼにより antitoxin が分解され、菌体内で toxin が活性化し、細胞活性を阻害することで Persister 形成を誘導する。本研究では、細菌の熱耐性における Persister 関連 TA システムの機能の解明を目的としている。

大腸菌遺伝子破壊株ライブラリー（Keio コレクション）から、Persister 形成に関与する TA システムだけでなく、その他の TA システムについても構造遺伝子欠損株を用いて実験を行った。その結果、複数の TA システムについて熱耐性への関与が示唆された。特に、YafQ-DinJ システムについて顕著な影響が見られたため、より詳細な検討を行った。toxin である YafQ は mRNA を切断するエンドリボヌクレアーゼ活性を有しており、標的遺伝子として、インドール合成酵素 TnaA などが明らかとなっている。TnaA によってトリプトファンから合成されるインドールは Persister の形成を阻害することも報告されている。YafQ が TnaA の mRNA を分解すると翻訳が阻害され、インドール産生が低下することで Persister 形成が促進される。

yafQ 欠損株、*dinJ* 欠損株および *tnaA* 欠損株を用いて熱耐性への各遺伝子の影響を検討した結果、野生株と比較してすべての欠損株で熱耐性が向上したことが示された。また、2 mM のインドールを添加した TSB 培地で 25℃、2 時間前処理後、加熱処理を行った結果、すべての菌株において熱耐性が低下した。一方、4 mM のトリプトファンを添加した TSB 培地で前培養を行い、加熱処理を行った場合、野生株と *yafQ* 欠損株において熱耐性が有意に低下したが、*dinJ* 欠損株と *tnaA* 欠損株においては影響が見られなかった。この結果から、トリプトファンは熱耐性に直接影響を及ぼすのではなく、合成されたインドールによって熱耐性が低下することが示唆された。

以上のことから、YafQ による tnaA の発現抑制を介した Persiter 形成促進機構が熱耐性を向上させることが示唆され、さらに TnaA によるインドール産生、そして環境中のインドール自身が熱耐性に大きく影響することが明らかとなった。

toxin antitoxin, persister cell, heat tolerance

発表責任者：益田時光（y.masuda@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A04a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A04 会場

大腸菌 PBP1B と MreB の同時欠損による溶菌現象のメカニズムの解明

Mechanism of cell lysis caused by simultaneous defects of PBP1B and MreB in *Escherichia coli*

○松本 紗代子、松倉 智史、小坂 智恵、坂庭 友子、岩井 伯隆、和地 正明（東工大生命理工学院）
○Sayoko MATSUMOTO, Satoshi MATSUKURA, Chie KOSAKA, Tomoko SAKANIWA, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Tokyo Tech.)

大腸菌の桿菌形態維持を担う要素としてペプチドグリカン層、およびアクチン様細胞骨格タンパク質 MreB の存在が知られている。ペプチドグリカンはペニシリン結合タンパク質(PBP)によって合成される。一方、MreB は細胞膜の内側にらせん状の構造体を形成しており、ペプチドグリカン合成の足場となっていることが示唆されている。この MreB の特異的阻害剤としてベンジルイソチオウレア誘導体 A22 が見出された。A22 処理によって MreB らせん構造が破壊されると大腸菌は球菌化し、増殖は停止するが溶菌はしない。一方、PBP の一つである PBP1B の欠損株に対して A22 処理を行うと溶菌することが見出された。しかし、PBP1B と同様の活性を示す PBP1A の欠損株に対し A22 処理を行っても溶菌は起こらない。本研究では、この PBP1B と MreB の同時欠損により溶菌が引き起こされるメカニズムの解明を目的とした。まず、溶菌現象に関わる因子の探索をおこなうため、PBP1B 欠損と温度感受性 *mreB* の二重変異株を親株として溶菌耐性変異株を分離した。溶菌耐性変異株について次世代シークエンサーによる変異点の解析を行ったところ、全ての溶菌耐性変異株において CpxAR 二成分制御系のセンサーキナーゼ CpxA の 42 番目のグルタミン酸がアラニンに置換される変異(*cpxAE42A* 変異)が見出された。次に、溶菌耐性変異株は CpxA 以外の変異を持つ可能性があるため、野生株 MG1655 を親株として PBP1B の単欠損株と PBP1B・CpxA の二重欠損株を作成し A22 処理を行った。その結果、PBP1B 単欠損株は溶菌し、PBP1B・CpxA 二重欠損株は溶菌しなかった。続いて、野生株および溶菌耐性変異株由来(*cpxAE42A* 変異)の *cpxA* をそれぞれプラスミドで相補したところ、野生株由来の *cpxA* を相補した場合は再び溶菌現象が見られ、溶菌耐性変異株由来の *cpxAE42A* を相補した場合では溶菌が抑制された。以上の結果から、PBP1B と MreB の同時欠損には CpxAR 二成分制御系の制御下にある遺伝子が関与していることがわかった。続いて、CpxAR 二成分制御系の制御下にある自己溶菌酵素 Slt に注目し、PBP1B・Slt の二重欠損株に A22 処理を行ったところ、溶菌現象の遅延が認められた。今後、溶菌を誘導する条件下での Slt を含む溶菌酵素の発現量を調べ、CpxAR 二成分制御系を介した溶菌シグナルの経路を検討したい。

PBP1B, MreB, CpxAR

発表責任者：和地正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2A04p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A04 会場

Pseudomonas sp. C8 株による異属微生物に対する増殖抑制機構
Growth repressing mechanism for different genus of bacteria induced by *Pseudomonas* sp. C8

○本荘 雅宏[1]、鈴木 研志[2]、西村 朋香[3]、田代 陽介[1]、二又 裕之[1,4]([1]静大院・総合科技、[2]静大院・自然科学教育部、[3]静大・工、[4]静大・グリーン研)
○Masahiro HONJO[1], Kenshi SUZUKI[2], Tomoka NISHIMURA[3], Yosuke TASHIRO[1], Hiroyuki FUTAMATA[1,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Educ. Div. Shizuoka Univ., [3]Dept. of Appl. Chem. and Bio. Eng. Shizuoka Univ., [4]Green Lab. Shizuoka Univ.)

複合微生物系の好適制御は農工医学分野において希求されているものの、その複雑さ故に経験則に頼らざるを得ない。好適制御技術の構築の一つとして、微生物間でどのような作用が生じているのかを明らかにすることは極めて重要である。これまでに我々は、一般環境細菌 *Peudomonas* sp. C8 株が、培養上清中に他の微生物の増殖を一時的に抑制する分子量 1033 の水溶性物質（増殖抑制物質）を生産することを見出した。*Comamonas testosteroni* R2 株に対する増殖抑制において、代謝が著しく変化することがメタボローム解析より示されている。しかし、具体的な増殖抑制機構については全くの不明である。そのため大腸菌を用いた本物質の作用機構解明を目的とした。

まず供試菌株 *Escherichia coli* BW25113 株の増殖に及ぼす影響を解析するため、粗精製した増殖抑制物質を 50%(v/v)添加した終濃度 25 mM グルコース含有最小培地で培養した。その結果 BW25113 株は二段階増殖を示し、培養開始約 10 時間までの一段目増殖ではグルコース消費がないにも関わらず菌密度は 5 倍に増加した。増殖抑制期間中、グルコースは僅かな減少傾向にあり、二段目増殖ではグルコースを完全に消費し、最終菌密度は増殖抑制物質無添加系と同等であった。増殖抑制中の細胞を洗浄後、呼吸活性を測定した結果、二段目増殖と同等の活性を示した。添加系における増殖速度定数は無添加系の高々70%であった。次に、BW25113 株に対する増殖抑制物質の作用機序を明らかにするため為、KEIO ライブラリー（BW25113 株一遺伝子欠損株コレクション）を用いて増殖抑制耐性株の取得を試みた。その結果、一次スクリーニングで得られた 106 株の耐性株について、二次スクリーニングでは詳細な増殖曲線を求め 10 株の耐性株を得た。この内の 3 株は物質輸送系タンパク質遺伝子欠損株であった。上述した様にフェノールを唯一の炭素源とする培地で培養した R2 株においても増殖抑制が観察されていることから、増殖抑制物質は基質の取り込みに作用しているわけではないと考えられる。

以上の結果から、C8 株由来増殖抑制物質は呼吸に関わる細胞膜上の輸送系タンパク質をブロックすることで結果的に細胞全体の代謝を極端に低下させ増殖抑制を引き起こしていること、また、別の輸送系タンパク質の発現に伴い増殖抑制を解除していることが示唆された。

growth repression, interaction, metabolism

発表責任者：本荘雅宏（honjo.masahiro.17@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A04p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A04 会場

LEA ペプチド発現による大腸菌の非生物的ストレス耐性の向上

In vivo expression of LEA peptide for enhancing abiotic stress tolerance in *E.coli*

○池野 慎也、パサック ニシット（九工大院生命体）
○Shinya IKENO, Nishit PATHAK (Kyutech)

【背景と目的】

LEA(Late Embryogenesis Abundant)タンパク質は植物の種子や一部の動物から発見された天然変性タンパク質であり、細胞内のタンパク質等を保護する機能を担っている。当研究室ではこの LEA タンパク質内の繰り返し配列をモチーフとして LEA ペプチドを設計し、大腸菌内で目的タンパク質と共発現させると目的タンパク質の発現量が増大することを報告してきた（Ikeno et al *PLOS One*, 8 (12), 2013）。さらに、LEA ペプチドの配列に変異を導入することで、その機能性の向上に成功した （Pathak et al, *J. Mol. Recognit.*, e2658, 2017）。しかし、当該ペプチドの細胞内での機能メカニズムは未だ明らかになっていない。

LEA タンパクは元来、様々なストレス耐性に関わっているタンパク質であり、その機構は様々な研究グループで開発が行われている。その代表的な機能として、分子シールド機能が挙げられ、これはタンパク質や細胞膜の表面を保護することにより、その凝集・融合を防ぐ働きである。一方、この LEA タンパク質には、イオンスカベンジャーとして機能する報告もあり、この機能が細胞の塩耐性を向上させると考えられている。

本研究では、LEA ペプチドが LEA タンパクと同様に大腸菌の塩ストレス耐性を向上させるのではないかと仮説をたて、実験・検証をおこなった。

【実験方法と結果】

pET 系の発現ベクターに、LEA ペプチドの遺伝子を導入し、発現ベクターを構築した。その形質転換大腸菌に発現誘導剤（IPTG）を添加することにより、細胞内に LEA ペプチドを発現させた。4 時間培養した形質転換大腸菌を終濃度（3%、5%、7%）の NaCl を含む LB 寒天培地に播種し、その後コロニーカウント法により塩耐性評価を行った。IPTG 添加量が増えるほどコロニー数が増加し、特に 7%の塩濃度では、コロニー形成が見られなかったが、LEA ペプチド発現を発現させることでコロニーが観察された。

一方、LEA ペプチドを発現させた大腸菌に対する熱・低温ストレスの影響も評価した。LEA ペプチドを発現させた大腸菌に対して、48℃および 4℃の環境に静置し、その後コロニーカウント法で評価を行った。どちらのストレスに対しても LEA ペプチドの発現が増えるほどコロニー数が増加した。また IPTG を添加後、4 時間培養させ LEA ペプチドを発現させた形質転換大腸菌を、高塩濃度の NaCl を含む培地に移して培養し、その細胞代謝活性を経時ごとに MTT アッセイで評価した。高塩濃度の条件下で培養 4 時間後までは代謝活性に有意差が確認されたが、8 時間後には有意な差が確認されなかった。

参考論文 N.Pathak, S.Ikeno, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 492 (3), 386-390, 2017

LEA, Abiotic stress, Peptide

発表責任者：池野慎也（ikeno@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：2A04p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A04 会場

緑膿菌環境単離株における細胞間コミュニケーション能力の切替え

Switching intercellular communication ability in P. aeruginosa environmental isolate

○須澤 由希[1]、遠矢 正城[2]、豊福 雅典[3]、尾花 望[3]、木暮 一啓[4]、野村 暢彦[3]([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境、[3]筑波大・生命環境系、[4]東京大・大気海洋研)
○ YUKI SUZAWA[1], MASASIRO TOYA[2], MASANORI TOYOFUKU[3], NOZOMU OBANA[3], KAZUHIRO KOGURE[4], NOBUHIKO NOMURA[3] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ. Grad. Sch. Env, [3]Tsukuba Univ. Fac. Env, [4]Tokyo Univ.)

近年、微生物も異種あるいは同種の細胞間でコミュニケーションを取り合い、多細胞的な集団挙動を示すことが明らかになってきた。Quorum sensing（QS）とはそのような微生物間コミュニケーションの一つであり、シグナル物質を介して周囲の菌体密度を感知し様々な遺伝子の発現を調節する機構である。QS を行う代表的な細菌の一つである緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*） は優れた環境適応能力により宿主体内のみならず海洋、河川、土壌など非常に幅広い自然環境中に分布しており、緑膿菌の自然環境中での動態を理解することは臨床的・生態的に重要であると言える。

本研究においては前述の背景より、異なる水環境から単離された緑膿菌における QS システムの解析を行った。分析の結果、これらの環境単離株の中にはモデル菌株として今までに多くの研究がなされてきた標準株 PA01 株と比べてシグナル生産量や応答性において異なった性質を示す株が複数存在し、特に貧栄養環境である外洋域からは QS システムの機能が一部欠損した株が多く単離されたことが明らかとなった。このことから、緑膿菌の細胞間コミュニケーション能力が環境に応じて変遷していることが考えられる。興味深いことに、QS 欠損株のうち、QS 関連遺伝子に挿入配列(IS)を持つ株がいくつか同定された。本研究では、その中でも、シグナル受容体である *lasR* に IS が挿入された、0cean-1187 株に着目し、QS における可動性因子の役割を明らかにすることを目的とした。この株は富栄養（LB)培地条件で培養すると集団から少なくとも 2 種類のコロニーの表現型が出現する。コロニー形態の変化は、*lasR* への IS の挿入に依存していることが示された。完全な *lasR* を持つ 0cean-1187 株を単離し、継代培養すると、*lasR* に IS が挿入された細胞が出現することが確認された。挿入された IS の配列を複数解析したところ、*lasR* の同一箇所に異なる向きで IS が挿入されている株が存在した。また、IS の挿入に伴って LasR 制御下にあるプロテアーゼ活性の低下が観察された。これらの結果より、0cean-1187 株の IS は可動性を失っておらず、*lasR* への IS の挿入が QS 活性を変化させることが明らかとなった。QS システムは一般的にエネルギーコストが高いと考えられていることから、IS の挿入・転出による QS の ON-OFF の切り替えは、環境に応じた生存戦略であると予想された。

Quorum sensing, Pseudomonas aeruginosa, Environmental isolate

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A04p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A04 会場

Paracoccus denitrificans は細胞間情報伝達を介して自身の生息域を拡大させる
Paracoccus denitrificans expands their territory via cell-cell communication

○森永 花菜[1]、豊福 雅典[2]、Andrew S. Utada[2]、尾花 望[2]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]筑波大学・生命環境系)
○Kana MORINAGA[1], Masanori TOYOFUKU[2], Andrew S. UTADA[2], Nozomu OBANA[2], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

環境中で多くの細菌は、低分子化合物のシグナル物質を介して相互作用している。この機構を介して遺伝子発現を調節することで、単一細胞では観察されないような集団としての挙動を変化させる。グラム陰性細菌で多く用いられるシグナル物質として、*N*-acyl homoserine lactone (AHL)が挙げられる。AHL はラクトン環とアシル基からなり、側鎖の炭素数が 4 から 18 までが報告されている。このうち長鎖 AHL は非常に疎水性が高く拡散しづらいことから、長鎖 AHL を介した情報伝達は未解明な部分が多い。当研究室では、グラム陰性非運動性細菌の *Paracoccus denitrificans* がメンブレンベシクルを介して C16-HSL を伝達し、細胞凝集を制御することを明らかにした (Toyofuku, *et al.*, 2017, ISME J)。

しかしながら、C16-HSL によってどのような凝集因子が制御されているのかは未解明であった。本研究では、その凝集因子を明らかにし、C16-HSL を介した集団制御にどのように関与するのかを解析した。*P. denitrificans* の C16-HSL 非生産株（Δ*pdnI*）を作製し液体培養したところ、WT では観察されないような強凝集性が示された。さらに、バイオフィルム形態にも違いが観察された。WT は薄いバイオフィルムを形成する一方、Δ*pdnI* は厚いバイオフィルムを形成した。これらのことより、*P. denitrificans* は C16-HSL を介して集団形成を抑制していることが示唆された。さらに、トランスポゾンを用いた解析により、凝集体形成関連遺伝子として推定多糖合成遺伝子 Pden_0842 を同定した。Δ*pdnI* より本遺伝子を欠損させると非凝集性を示し、さらに WT と同様に薄いバイオフィルムを形成した。これらのことより Pden_0842 は細胞間の付着に寄与する遺伝子であることが示唆された。さらに詳しく *P. denitrificans* の集団形成を観察するために、菌体の生育を平面上で観察可能な 2D デバイスチャンバーを用いて菌体の生育を経時的に観察した。WT は菌体間距離を保ちながら分裂する一方で、Δ*pdnI* は、細胞の境目が見分けられないほど密に生育することが観察された。*P. denitrificans* は C16-HSL を介して凝集具合を調整し、菌体間距離を保つことでより素早く基質表面上に広がることが明らかとなった。*P. denitrificans* は C16-HSL を介して集団形成を調整し、生息域を拡大することが考えられる。

cell-cell communication, biofilm, microfluidic device

講演番号：2A04p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A04 会場

Synechocystis sp. PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィルム形性を促進する c-di-GMP 合成酵素 Hik17 の機能解析
Characterization of a c-di-GMP synthase Hik17 that functions in salt-stress induced biofilm formation in *Synechocystis sp.* PCC6803.
○石川 航[1]、中鉢 千尋[1]、牧野 恒平[2]、渥美 駿[1]、解良 康太[1,2]、魚住 信之[1,2]([1]東北大工、[2]東北大院工)
○Ko Ishikawa[1], Chihiro Chubachi[1], Kohei Makino[2], Takeru Atsumi[1], Kota Kera[1,2], Nobuyuki Uozumi[1,2] ([1]Undergrad. Sch. Eng. , Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Eng. , Tohoku Univ.)

微生物は環境ストレスに応答して多糖などの細胞外基質を主成分とするバイオフィルムを形成し、細胞を保護する。バイオフィルム形成には、細胞内のセカンドメッセンジャーである c-di-GMP がシグナル分子として機能することが知られており、細胞内の c-di-GMP 量が増加に伴い、バイオフィルム形成が促進されることが明らかになっている。我々は、酸素発生型光合成細菌のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の環境ストレス適応を調べている中で，塩ストレスでバイオフィルム形成が生じることを明らかにしてきた。塩ストレス応答性バイオフィルム形成に関与する遺伝子探索の過程で、*hik17* 欠損株（Δ*hik17*）において、塩ストレス応答性バイオフィルム形成の低下が観察された。さらに、Hik17 は、c-di-GMP 合成酵素 (DGC) に広く保存された GGDEF ドメインを有していることから、DGC 活性を有することが示唆された。本発表では、Hik17 の詳細な機能を明らかにするために、Hik17 の基質特異性解析、反応速度論解析、タンパク質間相互作用解析を行った結果について報告する。大腸菌で His-tag 融合 Hik17 を異種発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより調製した部分精製酵素標品を解析に用いた。基質特異性解析では、基質として ATP または GTP を添加して反応させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。その結果、Hik17 は GTP のみを基質とすることが示された。反応速度論解析では、GTP 濃度に対して反応速度をプロットした結果、反応速度曲線はシグモイド型となった。この結果から、Hik17 は正の協同性を有することが示唆された。次に、二価カチオン要求性について解析した。8 種類の二価カチオン存在下で活性を測定した結果、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}の存在下で活性を示し、Mn^{2+}存在時に最大活性を示した。Mg^{2+}は DGC の活性中心に配位することが知られていることから、Mg^{2+}の濃度に対して反応速度をプロットし、最適濃度を検討した。その結果、Mg^{2+}の最適濃度は 6 mM であることが示された。さらに、pH 依存性について検討するため、pH 6.5～9.0 の緩衝液を用いて活性を測定したところ、pH 7.5 で反応させた際に最も高い活性を示した。Hik17 は GGDEF ドメインの他にシグナル受容ドメインとして知られる PAS ドメイン、環状ヌクレオチド結合ドメインとして知られる GAF ドメインを有する。そこで、DGC 活性に対する各ドメインの機能を明らかにするため、GGDEF ドメインを単独で発現させ、同様に DGC 活性を測定したが、DGC 活性を示さなかった。この結果から、Hik17 の DGC 活性には N 末端領域が重要であることが示された。DGC は一般に二量体を形成して機能することが知られているため、Blue-Native PAGE により Hik17 の高次構造を解析した。その結果、Hik17 は二量体以上の多量体を形成していることが示唆された。

cyanobacteria, biofilm formation, c-di-GMP

講演番号：2A04p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A04 会場

ピンク汚れ原因菌 *Methylobacterium populi* における Quorum Sensing を介したバイオフィルム形成機構の解析

Characterization of quorum sensing in *Methylobacterium populi* isolated from pink-pigmented biofilm

○諸星 知広[1]、茂呂 亮汰[1]、謝 肖男[2]、池田 宰[1] ([1]宇大院工、[2]宇大バイオ)
○Tomohiro MOROHOSHI[1], Ryota MORO[1], Xiaonan XIE[2], Tsukasa IKEDA[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Bio. Sci. Cent., Utsunomiya Univ.)

【目的】「ピンク汚れ」とも称されるピンク色のバイオフィルムは、風呂場や流しに発生するだけでなく、工場や水処理現場において膜の目詰りなど引き起こすなど、問題となっている。本研究グループでは、家庭の水回りで発生したピンク汚れからピンク色を呈する微生物を分離したところ、大部分が *Methylobacterium* 属細菌であることを明らかにしている。*Methylobacterium* 属細菌を含む多くのグラム陰性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した細胞間コミュニケーション機構 Quorum Sensing を有しており、バイオフィルム形成が Quorum Sensing に制御される例が多数報告されている。本研究では、家庭の風呂場から単離した *Methylobacterium populi* P-1M 株をモデル細菌として用い、バイオフィルムと Quorum Sensing の関連性を遺伝子レベルで解析することを目的とした。
【方法及び結果】P-1M 株の全ゲノム解析を行ったところ、染色体上に AHL 合成遺伝子（*mpoI*）と AHL レセプター遺伝子（*mpoR*）が存在することが明らかとなった。P-1M 株が生産する AHL を LC-MS/MS により解析したところ、アシル鎖内部に不飽和結合を有する C14:1-HSL と 3-hydroxy-C14-HSL の 2 種類の AHL を生産し、大部分が C14:1-HSL であることが明らかとなった。次に、P-1M 株の *mpoI* 及び *mpoR* をノンマーカー変異により破壊したところ、*mpoI* 破壊株は AHL の生産が完全に消失し、*mpoR* 破壊株では AHL 生産が大幅に減少した。さらに、各菌株のガラス試験管表面へのバイオフィルム形成を調べたところ、野生株は気液界面に均一なペリクル状のバイオフィルムを形成し、蒸留水を用いた洗浄により容易に剥離するが、*mpoI* 破壊株や *mpoR* 破壊株では、バイオフィルムの構造が波状に変化し、洗浄後も強固に付着することが明らかとなった。また、*mpoI* 破壊株に各種 AHL を添加してバイオフィルム形成を調べたところ、C14:1-HSL を加えた場合にのみ、野生株と同様の均一なバイオフィルムを形成し、洗浄により容易に剥離するように変化した。以上より、P-1M 株において、形成されるバイオフィルムの構造が C14:1-HSL を介した Quorum Sensing により制御されることが明らかとなった。

quorum sensing, *Methylobacterium*, biofilm

講演番号：2A04p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A04 会場

Paenibacillus 属細菌のバイオフィルム形成が芽胞の形態や耐性に影響を与える
Biofilm formation affects ths spore morphology and resistance in *Paenibacillus* species.
○加藤 寛子[1]、横山 佳奈[2]、尾花 望[3]、久保田 浩美[2]、八城 勢造[2]、永井 智[2]、野村 暢彦[3]([1]筑波大院・生命環境、[2]花王・安全性科学研、[3]筑波大・生命環境系)
○HIROKO KATO[1], KANA YOKOYAMA[2], NOZOMU OBANA[3], HIROMI KUBOTA[2], SEIZOU YASHIRO[2], SATOSHI NAGAI[2], NOBUHIKO NOMURA[3] ([1]Graduate school of Tsukuba Univ., [2]Kao Corp., [3]Tsukuba Univ.)

【背景・目的】一部の微生物は、休眠状態の細胞である芽胞を形成することが知られている。芽胞は栄養細胞に比べて薬剤および熱耐性が飛躍的に向上するため、食品製造環境でその制御が求められている。*Paenibaillus* 属細菌が形成する芽胞は、芽胞殺菌剤である過酢酸に対しても耐性を有することから、乳製品等食品の微生物汚染の要因として問題視されている。当研究室先行研究により、本属菌は微生物集団であるバイオフィルムを形成し、さらにその内部に芽胞を形成することが明らかとなった。本属菌は実環境中においてもバイオフィルムを形成して生育していると予想され、我々はバイオフィルム由来芽胞の性質を明らかとすることが重要であると考えた。そこで本研究では、浮遊菌由来芽胞とバイオフィルム由来芽胞の形態や耐性を解析し、その比較を行った。

【結果・考察】*Paenibacillus* 属細菌環境単離株のバイオフィルム形成に関与する因子を探索するため、核酸、タンパク質および多糖分解酵素を用いてバイオフィルム形成試験を行った。タンパク質分解酵素の添加によって細胞の物質表面への付着量が顕著に低下したことにより、細胞外タンパク質因子が本属菌の付着因子として機能すると推察された。

高いバイオフィルム形成量を有する *Paenibacillus* 属細菌環境単離株 3 種(*P. polymyxa*、*P. glucanolyticus* および *Paenibaillus* sp.)を用いて、バイオフィルム由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の長径を位相差顕微鏡により比較した。その結果、いずれの種においてもバイオフィルム由来芽胞の方が長径が長いことが示された。さらに、*P. polymyxa* および *Paenibacillus* sp. の芽胞形成過程を経時的に観察すると、芽胞形成前期よりバイオフィルム由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の細胞形態が異なっていた。このことから、バイオフィルム中の環境条件が芽胞形成の初期に影響を与えていると考えられた。次に、*P. polymyxa* と *Paenibacillus* sp. のバイオフィルム由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の過酢酸耐性を比較したところ、バイオフィルム由来芽胞の方が耐性が高いことが示された。

本研究より、本属菌のバイオフィルム由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の形態が異なり、さらに前者の方がより高い過酢酸耐性能を有していることが明らかとなった。タンパク質を主要構成成分とするバイオフィルム中の環境が芽胞形成初期段階の遺伝子発現を変化させることによって、芽胞の形態と性質に影響を与えると予想される。

spore, biofilm, *Paenibacillus*

講演番号：2A04p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A04 会場

舳倉島自然土壌から共分離された放線菌とミコール酸含有細菌の相互作用
Analysis of interaction between mixed isolates of actinomycetes and mycolic acid-containing bacteria from natural soil
○加藤 愛美、浅水 俊平、菅井 佳宣、尾仲 宏康（東大院農）
○Manami Kato, Shumpei Asamizu, Yoshinori Sugai, Hiroyasu Onaka (Univ. of Tokyo)

［目的］我々のグループでは、ミコール酸含有細菌（MACB）が放線菌に対して効果的に二次代謝産物生産を誘導する現象について研究を行っている。[1,2] 本研究では、これまでに放線菌 *Streptomyces lividans* と MACB の一種である *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 において観察された複合培養現象、[1,2] つまりミコール酸含有細菌による接触を介した放線菌二次代謝の誘導現象が自然界においても起こり得る普遍的現象であるのかを解明することを目的とし、自然土壌中から共分離された放線菌とミコール酸含有細菌における相互作用様式の解析を行ったので報告する。

［方法］2008 年に石川県舳倉島の土壌サンプルから、放線菌を主に約 1000 種の細菌を単離した。その単離記録から、36 個の単離ストックにおいて放線菌とそれ以外の異種細菌が共存分離されていることが確認された。興味深いことに、その内、多肉植物が生える土壌からフミン酸培地を用いて分離された HEK128 と笹植物が生える土壌から ISP4 培地を用いて分離された HEK138 の 2 個の単離ストックにおいて放線菌と MACB が一緒に単離されていることが確認された。そこでこれら自然由来の放線菌-MACB 共分離株について、再度複合培養を行い、相互作用様式について走査型電子顕微鏡（SEM）による両者の形態観察、また LC-QTOF-MS を用いた代謝産物の誘導解析を行った。

［結果・考察］共分離株の両者を再び分離し、16S rDNA 配列を再度解析した結果、放線菌 *Streptomyces variegatus* HEK138A と MACB である *Mycobacteirum septicum* HEK138M の組み合わせと、放線菌 *Amycolatopsis tolypophorous* HEK128A と MACB である *Nocardia veterana* HEK128M の組み合わせであった。HEK138 の組み合わせについて SEM による形態観察行ったところ、*S. lividans* と *T. pulmonis* において観察されたように、放線菌菌糸に対して MACB が接着している様子が観察された。固体培地を用いた対峙培養では、放線菌と MACB の接地面において色素の変化が観察され、放線菌の菌糸が MACB コロニー表面を這う様子や、突き刺さっている様子が観察された。二層式フラスコを用いて、二菌株が混ざっているときと、透析膜で隔てられているときの代謝産物の変化を LC-QTOF-MS により分析したところ、混ざっているときと、透析膜で隔てられているときそれぞれにおいて特異的に生産される代謝産物ピークが観測された。以上の結果から、環境適合における二次代謝のパターンは細胞間の距離に応じて変化することが明らかになった。

［文献］
[1] Onaka H., *et al.* AEM, 77, 400-406 (2011), [2] Asamizu S., *et al.* PlosONE, 10, e0142372 (2015)

Actinomycetes, Bacterial interaction, Secondary metabolism

講演番号：2A04p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A04 会場

プラスミド RP4 保持に伴う *Pseudomonas putida* KT2440 株の fitness 低下メカニズムの解明

How does plasmid RP4 cause decreased fitness of *Pseudomonas putida* KT2440?

○渡辺 菜月[1]、水口 千穂[1]、兼崎 友[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ)
○Natsuki WATANABE[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI Chiho[1], Yu KANESAKI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】プラスミドは宿主間を水平伝播し、宿主に抗生物質耐性能などの新規形質を付与するというプラス面を持つ一方で、生育負荷をもたらすというマイナス面も持っている。当研究グループでは、以前、*Pseudomonas putida* KT2440 株に多剤耐性プラスミド RP4 (IncP-1, 60 kb) を保持させ、非保持株と競合培養することにより、RP4 保持に伴う負荷が軽減した自然変異株 (以下進化株) を単離した。進化株では染色体上の PP_5401 と PP_5402 の遺伝子間領域に一塩基置換が生じていた。さらに、この遺伝子間領域において RP4 応答性転写単位 (以下 PP_5401.1) が発見され、RP4 保持に伴い上昇していた PP_5401.1 の転写量が、進化株では RP4 非保持株と同程度まで低下していることが判明した。そこで本研究では PP_5401.1 に着目し、①PP_5401.1 が KT2440 株に負荷をもたらす原因、②PP_5401.1 の作用機序の 2 点を調べた。【結果・考察】①を調べるべく、PP_5401.1 過剰発現株の表現型およびトランスクリプトームを解析した。PP_5401.1 の転写量、コロニーサイズ、コントロール株との競合培養時の fitness (過剰発現株の生き残りやすさ) を調べた結果、過剰発現株では PP_5401.1 の転写量上昇に伴い、コロニーサイズおよび fitness が低下していた (Fig. 1)。また、RNA-Seq 解析の結果、コントロール株と比較して 2 倍以上転写変動した 67 遺伝子 (全遺伝子の 1.1 %) と 1 つの non-coding RNA が特定され、これらには *hslVU* などのストレス応答性遺伝子が 9 遺伝子、σ 70 など転写制御に関わるものが 6 遺伝子、*ivd* や *mccB* などアミノ酸の代謝に関わるものが 7 遺伝子含まれていた。この結果から PP_5401.1 過剰発現株では、転写制御ネットワークやアミノ酸の代謝系が変化することで生育負荷が生じ、負荷に対応する為にストレス応答遺伝子の転写量が上昇したと考えられた。次に②を調べるべく、PP_5401.1 が低分子タンパク質をコードする可能性を検証した。PP_5401.1 に存在する推定 ORF（120 bp）を過剰発現させた KT2440 株では、RP4 保持株同様にコロニーサイズが低下していた (Fig. 2)。ORF 過剰発現株における fitness の評価や、PP_5401.1 がタンパク質として実際に発現しているかについても、報告する予定である。

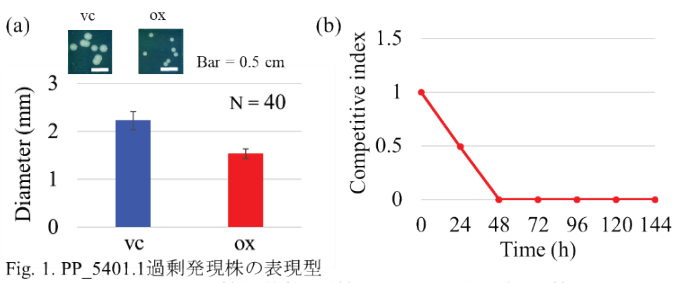


Fig. 1. PP_5401.1過剰発現株の表現型
a. ベクターコントロール株と過剰発現株のコロニーサイズを比較した。
b. PP_5401.1過剰発現株のfitnessを評価した。縦軸はcompetitive index (各培養時間の過剰発現株比率÷培養開始時の過剰発現株比率)を表す。

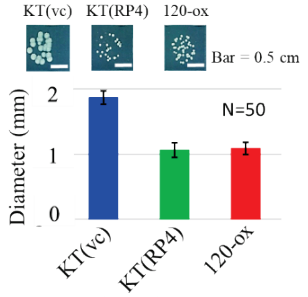


Fig. 2. ORF過剰発現株のコロニーサイズ
ベクターコントロール株とKT2440(RP4)株、過剰発現株のコロニーサイズを比較した。

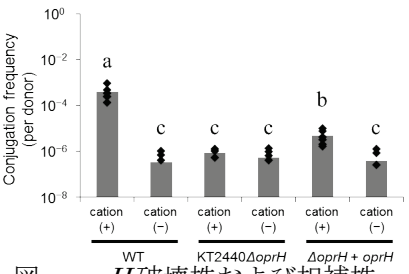
fitness cost, plasmid, Pseudomonas

講演番号：2A04p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A04 会場

IncP-7 群プラスミドの接合伝達成立における二価カチオンの作用機序の解析
Role of exogenous divalent cations in conjugation of IncP-7 plasmid pCAR1

○作田 郁子[1]、水口 千穂[1]、松井 一泰[1]、高橋 裕里香[2]、岡田 憲典[1]、山根 久和[3]、新谷 政己[4]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]富山県大生工科・生工研セ、[3]帝京大・バイオ、[4]静大院・総合科技)
○Ayako SAKUDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazuhiro MATSUI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[3], Masaki SHINTANI[4], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Teikyo Univ., [4]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達は、細菌に新規形質を付与するという特徴から、その利用や制御を目指した技術開発が期待されており、実環境中でのプラスミドの接合伝達様式を知ることは重要である。過去の研究において、環境試料中のカルバゾール分解プラスミド pCAR1 の挙動評価および試料の成分分析が行われ、pCAR1 の接合伝達に Ca^{2+}および Mg^{2+}が重要であることが示唆された。さらに様々な宿主を用いた解析の結果、供与菌として *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 株と *P. resinovorans* CA10dm4 株、受容菌として *P. putida* KT2440 株と CA10dm4 株を用いた場合に顕著なカチオン応答性が見られた。本研究では、この pCAR1 の接合伝達における二価カチオン応答性の原理理解を目的とし、トランスクリプトーム解析による因子の探索を行った。
【方法・結果】供与菌 Pf0-1 株-受容菌 KT2440 株の組み合わせについて、カチオン無添加および添加(各 400 μM の Ca^{2+}と Mg^{2+}) の条件下で 24 時間処理した、単独培養液および供与菌と受容菌の混合サンプルについて、Pf0-1 株、KT2440 株、pCAR1 上の遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。pCAR1 上の遺伝子については、単独培養時および混合サンプル中でカチオン添加による大きな転写変動は見られなかった。宿主染色体上の遺伝子については、単独培養時には Pf0-1 株で 11 個、KT2440 株で 123 個の遺伝子がカチオン存在下で転写変動していた。混合サンプル中では、Pf0-1 株染色体上の 7 個、KT2440 株染色体上の 126 個の遺伝子で転写量の変動が見られた。そのうち KT2440 株染色体上の 31 遺伝子が単独培養時および混合サンプル中で共に転写変動しており、Pf0-1 株染色体上には共通して転写変動した遺伝子は存在しなかった。Pf0-1 株・KT2440 株の二種を供与菌・受容菌のいずれに用いた場合にも二価カチオンの影響が見られることから、二種の菌株にオルソログの存在する遺伝子に着目した結果、Pf0-1 株染色体上にオルソログ（Pfl01_4241）が存在し、outer membrane protein H1 (OprH) をコードする KT2440 株染色体上の PP_1185 が、単独培養時および混合サンプル中でカチオン添加により転写量が減少した遺伝子として選抜された。そこで、PP_1185 を破壊した KT2440 株（KT2440*ΔoprH*）を受容菌とした接合実験の結果、破壊株ではカチオン応答性が見られなくなり、ベクターを用いて *oprH* を破壊株に相補した結果、カチオン応答性が一部回復した（図)。以上の結果より、*oprH* のカチオン応答性への関与が明らかとなった。



図．*oprH* 破壊株および相補株におけるカチオン応答性

conjugation, plasmid, divalent cations

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A04p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A04 会場

Stenotrophomonas maltophilia のメタノール走性の解析
Characterization of methanol taxis of *Stenotrophomonas maltophilia*
○古川 卓磨、渡邉 祐子、酒井 保藏、荷方 稔之（宇都宮大院工）
○Takuma FURUKAWA, Yuko WATANABE, Yasuzo SAKAI, Toshiyuki NIKATA (Utsunomiya Univ.)

【緒言】日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* は、フェノール類や芳香族有機塩素化合物などに対して走性を示す。これまでの研究で、本細菌のアルコールに対する走性に着目し、*S. maltophilia* がメタノール、エタノール、2-プロパノール、2-ブタノールに対して走性応答を示すことを明らかにした。さらに本細菌が有する 12 の走化性センサータンパク質のうち、Mcp5 が *S. maltophilia* のエタノールと 2-プロパノールに対する主要な走化性センサーであることが示唆されている。そこで本研究では、*S. maltophilia* の走化性センサー遺伝子 *mcp5* を破壊した遺伝子破壊株を用いて未だ走性センサーが特定されていないメタノールに対する走性応答における Mcp5 の役割について検討した。

【実験方法】*S. maltophilia* の遺伝子破壊株は相同組換えを用いて作製した。前培養は LB 液体培地を用いて 30℃で一晩培養し、本培養は合成培地である MOPS-glucose-MSV 培地を用いて、30℃で 20 時間振とう培養した。菌体は 5 mM $MgCl_2$ を含む 40 mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で 3 回洗浄後、濁度(OD_{660})を 0.1 になるように希釈し、走化性を測定した。走性応答は、菌体濁度あたりの集積初速度(cells/sec)である比集積初速度(cells/sec·OD_{660})を算出することにより評価した。

【結果および考察】メタノールに対する *S. maltophilia* の走性応答は濃度に依存しており、30 v/v%のメタノールに対して最も強い応答を示し、比集積初速度は 7.8 cells/sec·OD_{660} であった。走化性センサー遺伝子 *mcp5* を破壊した *S. maltophilia Δmcp5* を用いて測定したところ 30 v/v%メタノールに対する走性応答（2.5 cells/sec·OD_{660}）は、野生株の走性応答と比較して 67%減少していた。さらに *S. maltophilia Δmcp5* に *mcp5* が発現する組み換えプラスミドを導入した相補株 *S. maltophilia Δmcp5*(pJN*mcp5*)のメタノール、エタノール、2-プロパノールに対する走性は破壊株と比較していずれも回復していた。この結果より、Mcp5 がこれらのアルコールを感知する走性センサーであることが確認された。しかしながら *mcp5* の破壊株においてアルコールに対する走性応答は残存していたことから、Mcp5 以外のアルコール走性センサーの存在が示唆されたため、*mcp5* に加えて *mcp1,2,4,6,7,8,11* を破壊した八重破壊株を用いて 2-プロパノールに対する走性応答を測定したところ *Δmcp5* と同等の走性応答を示した。今後は、さらに網羅的な走化性センサー遺伝子の多重破壊株を作成し、未知のアルコール走性センサー遺伝子の同定を行う予定である。

chemotaxis, *Stenotrophomonas maltophilia*, alcohol

講演番号：2A04p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A04 会場

Stenotrophomonas maltophilia のリン酸走性センサーの解析

Identification of methyl-accepting chemotaxis genes for phosphate taxis of *Stenotrophomonas maltophilia*

○柳沢 優、酒井 保藏、荷方 稔之（宇都宮大院工）
○Yu YANAGISAWA, Yasuzo SAKAI, Toshiyuki NIKATA (Utsunomiya Univ.)

【緒言】日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* は、ビスフェノール A を含む多種のフェノール類に対して走性を示す細菌であり、リン酸イオンに対しても強い走性を示す。これまでの研究で、本細菌のリン酸イオンを感知する走性センサータンパク質には高濃度(Mcp7)および低濃度(Mcp10)を感知する走性センサーが存在することを明らかにしてきた。また、*S. maltophilia* はリン酸十分状態に比べ、リン酸欠乏状態の方がより強くリン酸イオンに対して走性を示す。緑膿菌や大腸菌では、リン酸欠乏下で二成分調節系 PhoB-PhoR による *pho* レギュロン遺伝子群の誘導発現が知られている。そこで *S. maltophilia* のリン酸走性においても PhoB-PhoR によって調節されているか検討するため、これらの遺伝子破壊株を作成し、リン酸イオンに対する走化性を測定することでリン酸走性センサー遺伝子の発現調節における解析を試みた。

【方法】*phoB*、*phoR* の両遺伝子欠損変異プラスミドを作成し、接合伝達により *S. maltophilia* JCM1975（標準菌株）に導入後、2 回の相同組換えを起こすことで *phoBR* の破壊株 *S. maltophilia* Δ*phoBR* を作製した。野生株、破壊株ともに同条件で走化性の測定を行った。前培養は LB 液体培地を用い、本培養ではリンを含まない合成培地(MOPS-P-MSV)を用いて、30°C で 18h 培養した（リン酸欠乏条件）。菌体は 5 mM $MgCl_2$ を含む 40 mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で 3 回洗浄後、濁度(OD_{660})を 0.050 になるように希釈し、走化性を測定した。走性応答は、菌体濁度あたりの集積初速度(cells/sec)である比集積初速度(cells/sec·OD_{660})を算出することにより評価した。

【結果および考察】 リン酸飢餓条件下におけるリン酸イオンに対する *S. maltophilia* の走性応答は、濃度に依存していた。野生株の走性応答は 5 mM、1 mM の高濃度リン酸イオンに対してそれぞれ 19.7、15.8 (cells/sec·OD_{660})と強い応答であったのに対し、同濃度における *S. maltophilia* Δ*phoBR* の応答はそれぞれ 12.2、6.5 (cells/sec · OD_{660})と減少していた。また、0.01mM、0.005mM の低濃度リン酸イオンに対する野生株の走性応答はそれぞれ 8.3、8.0 (cells/sec·OD_{660})であったのに対し、*S. maltophilia* Δ*phoBR* の応答は完全に消失していた。このことから *S. maltophilia* において低濃度リン酸センサー(Mcp10)は PhoB-PhoR によって転写が調節され、高濃度リン酸センサー(Mcp7)は PhoB-PhoR 以外の調節系によっても制御されていることが示唆された。

chemotaxis, phosphoric acid, PhoB-PhoR

発表責任者：荷方稔之（nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2A04p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A04 会場

大腸菌 YgiT antitoxin による運動性およびバイオフィルム形成促進に関与する遺伝子の探索

Analysis for the genes involved in promoting motility and biofilm formation by YgiT antitoxin

○横井 亮磨[1]、山口 良弘[1,2] ([1]大阪市大院理、[2]大阪市大複合先端)
○Ryoma YOKOI[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA)

【目的】原核生物において toxin-antitoxin (TA) system は自殺遺伝子を制御するシステムであり、自殺を引き起こす toxin およびそれを抑制する antitoxin で構成される。ストレス条件下では antitoxin がストレス誘導性プロテアーゼにより分解され、遊離した toxin が生育阻害を引き起こす。このため、TA system はストレス条件下での生存に関与すると考えられている。バイオフィルムは微生物集合体であり、バイオフィルム内細菌のストレス耐性は非常に高い。当初、大腸菌の MqsR は運動性を介したバイオフィルム形成促進因子として同定された。しかし、当研究室により MqsR は、発現した大腸菌の生育を阻害する toxin であること、および下流に存在する YgiT が antitoxin の TA system を構築することが明らかとなった。さらに、MqsR ではなく YgiT が運動性を上昇しバイオフィルム形成を促進することが示唆された。そこで、MqsR および YgiT のどちらが運動性およびバイオフィルム形成促進因子なのかを解析し、本バイオフィルム形成促進に関与する遺伝子を探索した。

【方法および結果】MqsR および YgiT を発現させた大腸菌の運動性を測定した結果、MqsR の発現は運動性を消失させたが、YgiT では運動性を促進した。次に、YgiT の発現がバイオフィルム形成に与える影響を測定した。その結果、YgiT は大腸菌のバイオフィルム形成を促進することが明らかとなった。さらに、YgiT の発現がバイオフィルム形成に重要な curli 線毛の発現に与える影響を調べた。Curli 線毛を染色する Congo Red 培地（CR 培地）上のコロニーの色から curli 線毛の発現量を定性的に解析した結果、 YgiT によって curli 線毛の発現量は減少することが示唆された。従って、YgiT は curli 線毛量を減少させることで運動性を上昇させ、バイオフィルム形成を促進することが推測された。そこで、YgiT による運動性促進機構の解明を試みた。YgiT は *mqsRygiT* オペロン上流の回文配列 ACCT (N3) AGGT に結合する。YgiT が転写調節因子としてバイオフィルム形成促進に寄与すると考え、ORF 上流に YgiT 結合配列が存在する遺伝子を探索した。その結果、見出された *fimI*、*tynA*、*yagL* および *csgD* 遺伝子の欠損株においても YgiT はバイオフィルム形成を促進した。よって、YgiT によるバイオフィルム形成促進に上記遺伝子は関与しないことが示唆された。そこで、トランスポゾンを用いてランダムな挿入変異株を作成し、YgiT による運動性促進に関与する遺伝子の探索を試みた。現在、YgiT 発現によって curli 線毛の発現量が減少せず、運動性が促進されない株を取得中である。

Toxin-antitoxin system, Biofilm, *Escherichia coli*

講演番号：2A04p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A04 会場

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus*PCC 7942 における DNA 複製とリン酸代謝間の相互作用解析

Relationship between DNA replication and phosphate metabolism in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

辻出 亘寛[1]、大林 龍胆[2]、吉川 博文[1]、廣田 隆一[3]、○渡辺 智[1] ([1]東京農大生命、[2]遺伝研、[3]広島大先端)

Nobuhiro Tsujide[1], Ryudo Ohbayashi[2], Hirofumi Yoshikawa[1], Ryuuichi Hirota[3], ○ Satoru Watanabe[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]NIG, [3]Hiroshima Univ.)

シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC 7942（以下*S.* 7942）は細胞あたり複数コピーの染色体を保持している。これまでの研究から*S.* 7942の染色体コピー数は培養環境に応じて変動し、この制御には培地中のリン酸量が深く関与することが示された。リンはDNAを構成する主要要素であるが、リン酸代謝がDNA複製をどのように影響するのか、詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。本研究ではDNA複製とリン酸代謝間の相互作用と制御メカニズムの解明を目的とし、リン酸量を制限した条件でのDNA複製や細胞増殖への影響を解析した。

増殖を同調させた細胞を通常培地、リン酸欠乏培地に培地交換しDNA複製および細胞分裂頻度を比較した。通常培地と比較してリン酸欠乏培地では細胞数が一過的に増加したことから、リン酸欠乏ストレスは細胞分裂を促進することが示された。一方でリン酸欠乏によりDNA複製の開始が阻害された。複製開始阻害の分子機構を明らかにするため、複製開始因子DnaAおよびDNAヘリカーゼDnaBの複製起点領域（*oriC*）への結合能をクロマチン免疫沈降法-定量リアルタイムPCR法により比較解析した。その結果、リン酸欠乏培地への交換6時間後においてDnaBの*oriC*領域への結合能が約6割低下した。一方DnaAの*oriC*領域への結合能は低下しなかったことから、リン酸欠乏はDnaBの*oriC*へのローディングを阻害することが示された。

また、細胞内のリン酸源であるポリリン酸を染色しS. 7942の各増殖ステージおよびリン酸欠乏による影響を解析した。ポリリン酸量は染色体コピー数と同様に誘動期に一過的に蓄積し、リン酸が欠乏する定常期で減少した。またリン酸欠乏培地への交換4時間後に約9割のポリリン酸が分解されていることも示された。ポリリン酸分解の役割を調べるためポリリン酸分解酵素を破壊し、細胞増殖への影響を解析した。その結果、リン酸欠乏下で*S.* 7942の細胞分裂は阻害された。これらの結果よりリン酸欠乏条件では細胞中のポリリン酸を分解し増殖に利用していることが示唆された。

cyanobacteria, DNA replication, phosphate

発表責任者：渡辺　智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：2A04p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A04 会場

DNA 傷害ストレスにより誘導されるシアノバクテリア SSB タンパク質の局在化に関する研究
SSB localization response caused by DNA damage stress in cyanobacteria.
○栗原 亜実[1]、大林 龍胆[2]、吉川 博文[1]、渡辺 智[1] ([1]東京農大院バイオ、[2]遺伝研)
○Ami Kurihara[1], Ryudo Ohbayashi[2], Hirofumi Yoshikawa[1], Satoru Watanabe[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]NIG)

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942（以下、*S.* 7942）は酸素発生型の光合成を行う原核藻類である。光合成を行なう際に光化学系I・IIにおいて活性酸素種（以下、ROS）が発生するが ROS は一本鎖 DNA 切断を引き起こすため、シアノバクテリアは他のモデル細菌とは異なる特徴的な ROS 消去系や一本鎖 DNA 修復系を持つと考えられる。一本鎖 DNA 修復系がシアノバクテリア間において保存性が高いことや、大腸菌と比べ高い UV 耐性を保持することが分かっているが、詳細な DNA 修復因子の研究は行われていない。Single strand binding protein (以下 SSB)は一本鎖 DNA 修復の開始因子であり、一本鎖 DNA の再会合や分解を防ぐ。モデル細菌と比べシアノバクテリアの SSB は C 末端が短く、特徴的な構造であることから SSB に着目し研究を行った。

S. 7942 には SSB 相同遺伝子 (Synpcc7942_0301) が同定されており、蛍光タンパク質融合遺伝子を用いた顕微鏡観察から染色体上に局在することが示されている。しかし、これは外来性のプロモーターを用いた誘導発現系であったため、シアノバクテリアの内在性 SSB と GFP を融合発現させた。その結果、*S.* 7942 細胞内中において SSB-GFP は局在化し、foci を形成した。次にストレス時の SSB の挙動を解析した。酸化ストレスを引き起こす H_2O_2 や DNA 障害を誘発するマイトマイシン C（以下、MMC）添加により SSB-GFP の foci 数の増加が観察された。また、SSB タンパク質の発現量は変化しないことから SSB の foci 形成は質的な制御であることが示唆された。

一方、当研究室グループにおける解析から染色体分布に関与すると知られる *parA* 遺伝子を *S.* 7942 において欠失すると、染色体分布に異常が起こること、また UV ストレスや MMC 添加時に生存率が低下することが分かった。Δ*parA* における SSB-GFP の局在を観察したところ、Δ*parA* 株ではストレス下のみならず非ストレス下においても SSB-GFP の foci は観察されないが、タンパク質の発現は確認できた。また、トランスクリプトーム解析より Δ*parA* はストレス応答に関する遺伝子の発現が上昇した。現在 *parA* と SSB の局在の関係性について解析中である。

cyanobacteria, DNA repair, Oxidative stress

講演番号：2A04p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A04 会場

シアノバクテリアの DnaJ（Hsp40）/J タンパク質の多彩な機能―DnaK（Hsp70）と HtpG（Hsp90）との相互作用について
Structural and functional diversity of in the cyanobacterial DnaJ/Hsp40 (J protein)
○仲本 準（埼玉大院理工）
○Hitoshi NAKAMOTO (Saitama Univ)

J タンパク質は、～70 個のアミノ酸残基からなる J ドメインをもつタンパク質で、大腸菌の DnaJ や出芽酵母の Ydj1（Hsp40）などがよく知られている。DnaJ や Ydj1 は、代表的な分子シャペロンである DnaK/Hsp70 のコシャペロン（補助因子）として、DnaK/Hsp70 シャペロン系を構成し、さまざまな細胞機能に関係している。J タンパク質は、ドメインや特徴的な配列等に基づいて三つの型（I 型、II 型、III 型）に分類される。II 型や III 型に分類されるメンバー間には、構造・機能的な著しい多様性が見られる。なお、DnaJ や Ydj1 は I 型 J タンパク質である。J タンパク質は多様化しており、ヒトの細胞の場合、50 種を超える J タンパク質が存在すると報告されているが、一部の J タンパク質を除いて、その構造や機能にはついては謎が多い。我々は、本研究の実験材料に用いたシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* のゲノムに、10 種類の J タンパク質をコードする遺伝子をみつけた。ゲノムサイズが倍近い大腸菌には 6 種類の J タンパク質が存在し、それらがすべて必須ではないのに対して、このシアノバクテリアでは複数種の J タンパク質が必須である。本研究では、上記 10 種のうち、I 型の 1 種、II 型から 1 種、III 型から 3 種を選んで、これらのタンパク質を精製し生化学的解析を行った。

S. elongatus には、3 種類の DnaK が存在するが、必須の DnaK2 と各 J タンパク質との相互作用を調べた。大腸菌の DnaJ は、DnaK の ATPase 活性を増大することで DnaK の ATP 型（基質低親和性）から ADP 型（基質高親和性）への変換を促進しシャペロン作用にとって必須の働きをすると考えられている。シアノバクテリアの 5 種類の J タンパク質の内、I 型、II 型（DnaJ2）と III 型の一つが、DnaK2 の ATP 活性を促進した。III 型の二つの J タンパク質の影響は見られなかった。さらに I 型と II 型は、DnaK2 と協調的に働き、変性タンパク質の折り畳みを助けたが、すべての III 型にはこのようなコシャペロンとしての働きは観察されなかった。現在、これらの J タンパク質と DnaK2 以外の DnaK パラログとの相互作用の解析も行っている。

我々は既に、DnaJ2 と HtpG（Hsp90）が物理的に相互作用することを明らかにしたが、本研究では、DnaJ2 が HtpG の ATPase 活性を阻害することを見出した。真核細胞では、Hsp90 の働きにとって必須の働きをするコシャペロンが多数知られているが、原核細胞 Hsp90 のコシャペロンは報告されていない。我々は、DnaJ2 が、DnaK2 に加えて、HtpG の機能も制御するコシャペロンとして働くことを支持する結果を得たので発表する。

Molecular chaperone, DnaK, J protein

講演番号：2A04p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A04 会場

水溶性アスタキサンチン結合タンパク質による微細藻類の光酸化ストレス防御機構

A novel protection for photooxidative stress by astaxanthin binding water-soluble protein in eukaryotic microalgae

○豊島 拓樹[1]、吉田 梨沙子[1]、小飯田 えり[1]、山崎 敬太[1]、小俣 翼[1]、宮田 彩実[1]、大島 一輝[1]、金子 隆之[1]、宮崎 貴章[1]、石毛 太一郎[2]、久保田 恵理[2]、高市 真一[3]、川崎 信治[1]([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノムセンター、[3]東農大微生物)
○Hiroki TOYOSHIMA[1], Risako YOSHIDA[1], Eri KOIIDA[1], Keita YAMAZAKI[1], Tubasa OMATA[1], Ami MIYATA[1], Kazuki OSHIMA[1], Takayuki KANEKO[1], Takaaki MIYAZAKI[1], Taitichiro ISHIGE[2], Eri KUBOTA[2], Sinichi TAKAICHI[3], Shinji KAWASAKI[1] ([1]TUA Bio, [2]TUA Genome, [3]TUA Microbiol)

【目的】光合成生物は強光照射を伴う乾燥や塩ストレスに晒されると、光酸化ストレスを発生して枯死に至る。当研究グループでは、一般の植物が生育困難な過酷な環境から光合成生物の単離を行ってきた。単離株の中で真夏のアスファルト表面から単離された真核微細藻類 Ki-4 株（*Scenedesmus* sp. Ki-4）は、強光が付随する環境ストレス下で藻体を赤色化し長期間生存した。この赤色化に着目して研究を進めた結果、真核植物界で初めてとなる水溶性カロテノイド結合タンパク質が精製され、アスタキサンチンを結合することから AstaP と命名された [1)]。光合成生物の水溶性カロテノイド結合タンパク質は、原核生物のラン藻に分布する orange carotenoid protein（OCP）が知られているが、真核植物界には知られていなかった。OCP はフィコビリソーム周辺に局在し強光の熱散逸機構に関与するのに対し、AstaP はペリプラズムに局在し、その機能の詳細は不明である。AstaP は光酸化ストレス開始後にすみやかに発現誘導することから、光酸化ストレス防御への関与が推察された。本研究では植物生理学的に新規な AstaP による光酸化ストレス防御機構に関して知見を得るために、AstaP の他藻類における分布調査とストレス耐性期間中の発現プロファイルの解析を行った。
【方法・結果】AstaP は Ki-4 株の近縁種にも分布したが、ストレス付与後の顕著な発現量は観察されなかった。Ki-4 株に強光照射下で高塩濃度（0.7 M NaCl）のストレスを与え、その後の経時的な光合成活性測定、代謝産物解析、トランスクリプトーム解析を行った。比較対象としてモデル藻類の *Chlamydomonas reinhardtii* に同等の強光照射下で低塩濃度（0.2 M NaCl）ストレスを付与して比較解析を行った。その結果、モデル藻類は光合成活性が低下して回復しなかったが、Ki-4 株は短時間で回復し、その回復プロファイルから回復期と耐性期に区分できた。Ki-4 株では光合成回復期に大幅な遺伝子発現の変動が観察され、AstaP の mRNA は回復期の初期に発現が誘導された。また回復期後期にはアスタキサンチンを含むカロテノイド色素の顕著な組成変化が観察された。興味深いことに、AstaP タンパク質の顕著な発現は回復期の後期以降であったことから、光合成の回復期初期には AstaP に依存しないストレス防御機構の存在が推察された。AstaP タンパク質の発現時期はアスタキサンチン含量に匹敵してルテインやカンタキサンチン含量も高いことから、AstaP はアスタキサンチンを細胞内で選択的かつ特異的に結合することが示唆された。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).

photooxidative stress, carotenoprotein, astaxanthin

講演番号：2A04p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A04 会場

リボソームと細胞内 Mg^{2+}濃度の相関性
Correlations between ribosomes and intracellular Mg^{2+} concentration
○赤沼 元気、並木 晃、山崎 晃太郎、矢岸 勇真、河村 富士夫、山田 康之（立教大・理・生命）
○ Genki AKANUMA, Hikaru NAMIKI, Koutarou YAMAZAKI, Yuma YAGISHI, Fujio KAWAMURA, Yasuyuki KATO-YAMADA (Rikkyo Univ)

枯草菌 50S リボソームを構成する L34 リボソームタンパク質の欠損は、70S リボソームの複合体形成量低下とそれに伴う増殖速度低下を引き起こす。しかし、細胞内 Mg^{2+}濃度の向上により L34 欠損株の 70S リボソーム形成量と増殖速度は回復する。Mg^{2+}はリボソームタンパク質と rRNA の結合や 30S-50S サブユニットの会合に必須であり、リボソームの構造維持には欠かせない金属イオンである。L34 欠損によって不安定化したリボソームの構造が Mg^{2+}によって安定化されると仮定すると、L34 以外のリボソームタンパク質欠損の影響も、細胞内 Mg^{2+}濃度の向上によって抑制できることが予想される。そこで、L34 欠損株と同様に 70S リボソーム複合体の形成異常が見られる L1、L23、L36、S6 の各リボソームタンパク質欠損株を用いて、Mg^{2+}によるリボソームタンパク質機能の相補効果を検証した。

各変異株の細胞内 Mg^{2+}濃度の向上を、Mg^{2+}の取り込みを担う MgtE の高発現と、Mg^{2+}の排出を担う YhdP の欠損により誘導した。対数増殖期の菌体に含まれる Mg^{2+}量を測定し、生菌数と細胞のサイズから Mg^{2+}濃度を算出した結果、各変異株における細胞内 Mg^{2+}濃度の向上が実際に確認された。このようにして細胞内 Mg^{2+}濃度を人為的に向上させることで、各リボソームタンパク質欠損株の 70S リボソーム形成量の回復が認められた。さらに、L1 欠損株と L23 欠損株では、Mg^{2+}濃度向上による増殖速度の回復も観察された。これは 70S リボソーム量の回復による細胞内翻訳活性向上の効果であると考えられる。一方、L1 欠損株では胞子形成能の低下（形成率は 0.01%以下）も観察されているが、細胞内 Mg^{2+}濃度向上によって胞子形成能の回復も認められた。以上の結果は、恐らくリボソームの構造維持という点において、種々のリボソームタンパク質機能が Mg^{2+}によって相補可能であることを示している。

この様にリボソーム機能に重要な Mg^{2+}だが、細胞内に遊離した状態で存在する Mg^{2+}は 5%程度であり、90%以上は核酸やタンパク質にキレートされている。リボソーム 1 分子には 170 原子以上の Mg^{2+}が含まれ、細胞内に存在する 25%の Mg^{2+}がリボソームによってキレートされていると考えられている。従ってリボソームは、Mg^{2+}の貯蔵庫としても機能する可能性がある。この点について検証した結果についても併せて発表したい。

Magnesium, Ribosome, Bacillus subtilis

講演番号：2A04p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A04 会場

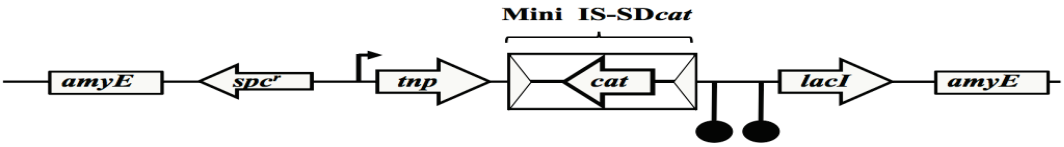
枯草菌 168 株が挿入配列を持たない理由の解明

The investigation of the reason why Bacillus subtilis strain 168 don't have insertion sequences

○徳山 麻里[1]、吉川 博文[1]、朝井 計[1]、原田 翔太[1]、兼崎 友[2]([1]東京農大院バイオ、[2]東京農大ゲノム解析セ)
○ MARI TOKUYAMA[1], HIROHUMI YOSHIKAWA[1], KEI ASAI[1], SHOTA HARADA[1], YU KANESAKI[2] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 近年、ゲノム解析技術の進歩によって、多種多様な IS がほとんどの真正細菌、古細菌に普遍的に存在することが明らかとなったが、例外的に枯草菌 168 株には IS が存在しなかった。しかし、枯草菌の亜種や同種である納豆菌には複数の IS が存在する。そこで、枯草菌 168 株に納豆菌の各種 IS を導入したところ、その中に高頻度に転移する IS（IS*256Bsu1*）を見出した。この IS*256Bsu1* は、納豆菌では複製型転移し、ゲノム上に複数コピー存在する。本研究は、IS*256Bsu1* を人為的に導入した枯草菌 168 株の動態を解析することで、枯草菌 168 株が IS を持たないように進化した要因や機構の解明を目的としている。

【結果と考察】 本実験では、トランスポゼース遺伝子（*tnp*）の転写量を人為的に誘導できる改変型 IS*256Bsu1*（下図）を *amyE* 領域に導入した枯草菌 168 株を用いた。Mini IS-SD*cat* はプロモーターを持たないので、IS がプロモーターの下流に転移したクロラムフェニコール耐性株として IS 転移株を選択できる。



tnp 誘導下でこの株を LB 培地で 37℃一晩振盪培養後、新たな LB 培地に希釈し継代培養していくと、一旦 IS 転移体の蓄積量が上昇するものの、その後減少することが観察された。この継代培養後期に、IS 転移体を生じない枯草菌株が出現し、集団内で増加していくことが分った。その枯草菌株は *tnp* 遺伝子内に欠失によるフレームシフト変異を持ったために、転移能を失った *tnp* ヌル変異体であった。また、この現象はトランスポゼースが細胞増殖に影響を与える過剰量を誘導した場合にのみ観察された。これらのことから、168 株ではトランスポゼースの増殖毒性に対抗する手段としてヌル変異体の出現が誘発され、最終的に IS が消失していったと考えられた。

一方、IS では多くの *tnp* が翻訳フレームシフトによる発現制御を受けている。IS256family には全長が保存されたものと分断され翻訳フレームシフト制御されているものがある。トランスポゼースの増殖毒性を回避するために生じたフレームシフト変異が、進化の過程でその発現を低レベルに抑制するために翻訳フレームシフト制御へ移行したことが示唆される。

transposase, frame shift, Bacillus subtilis strain 168

講演番号：2A04p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A04 会場

枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析
Regulation of gene expression of *ugtP* encoding a glucolipid synthase in *Bacillus subtilis*
○松岡 聡[1]、篠原 嵩人[1]、朝井 計[2]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大・理工研、[2]東京農大・バイオ)
○Satoshi MATSUOKA[1], Takahito SHINOHARA[1], Kei ASAI[2], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ. Agric.)

枯草菌において、糖脂質は膜脂質の約 10%を占めるが、前駆体のジアシルグリセロールに UDP-Glc から Glc がモノ(M)、ジ(Di)、トリ(Tri)と段階的に付加することによって合成される。この反応を触媒するのがグリコシルトランスフェラーゼ UgtP である。*ugtP* 破壊株は、細胞が太く短く湾曲した形態となり、細胞表層の恒常性に関与する extracytoplasmic function(ECF)シグマ因子のうち、SigM、SigV、SigX の脱抑制が見られた(Matsuoka *et al.*, 2011)。*ugtP* を破壊することにより、細胞に様々な影響が見られることから、糖脂質は枯草菌で重要な役割をしていると示唆される。本研究では、未解明の枯草菌 *ugtP* の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。昨年度大会で、*ugtP* は自身のプロモーターの他、上流の *metA* とオペロンを形成しており、このオペロンの転写は *ugtP* 破壊で上昇することを報告した。本大会では、*ugtP* 破壊における *metA*-*ugtP* 転写上昇に関与する ECF シグマ因子を同定するために、*ugtP* 破壊で脱抑制された ECF シグマ破壊株を用いて *metA* プロモーター(P_{metA})の転写解析を行った。その結果、単独 ECF シグマの破壊の導入で、*ugtP* 破壊における P_{metA} の転写は低下した。更に二重、三重で ECF シグマの破壊を導入したが、P_{metA} は野生株レベルまで低下しなかった。ECF シグマ因子は類似したプロモーター配列を認識し、ある ECF シグマを欠損した時には他の ECF シグマ因子がその転写を補償するため、ECF 多重破壊の影響が表れなかったためと考えられた。そこで、ugtP と ECF シグマ因子破壊株の形態観察をしたところ、*ugtP sigM* 二重破壊株のみが球状となり、NaCl 感受性になったことから、生理学的に *ugtP* の発現制御と SigM には関連があることが示唆された。そこで、SigM 活性化条件のひとつである高 NaCl 環境下において、糖脂質組成を調べたところ、糖脂質量は減少し、UgtP 量は増加した。塩ストレスにより UgtP 酵素活性が変化し、糖脂質量が減少、その結果 SigM の活性化が引き起こされたと考えられる。以上から、枯草菌 *ugtP* の発現は糖脂質量の変化による ECF シグマ因子の活性化を介したフィードバック制御を受けていると示唆された。

glucolipid, ECF sigma factor, UgtP

発表責任者：松岡　聡（matsuoka@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：2A05a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A05 会場

Analysis of AoFus3 and its interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae*

○ Taoning MO[1], Takuya KATAYAMA[1], Ozgur BAYRAM[2], Daigo TAKEMOTO[3], Gerhard H. BRAUS[4], Katsuhiko KITAMOTO[5], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Gottingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

[Background] Cell fusion plays a pivotal role in filamentous fungi, since cell fusion occurs during vegetative growth besides sexual reproduction. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, of which cells fuse only during mating, a Fus3 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade and downstream transcription factor Ste12 are essential for cell fusion. Although their orthologs are conserved, other factors on the basis of Fus3 MAPK cascade may exist for the cell fusion during vegetative growth in filamentous fungi. We previously identified a Ste12 ortholog AoSte12 and novel protein FipC as AoFus3-interacting proteins in *Aspergillus oryzae* [1]. Cell fusion ability is lost in Δ*Aofus3*, reduced moderately in Δ*Aoste12*, and drastically in Δ*fipC*. Moreover, cell fusion-related genes (*Aoham-6*, *Aoham-7*, *Aoham-8*, *AonosA*) were downregulated in these deletion strains, indicating that AoFus3, FipC and AoSte12 play the positive role in cell fusion. However, their detailed relationship for the regulation of cell fusion is still unclear. Therefore, we performed further genetic analysis of *Aofus3*, *fipC* and *Aoste12* for clarifying a specific mechanism of cell fusion in filamentous fungi.

[Results] To extensively investigate the function of AoSte12 in cell fusion, we examined the effect of *Aoste12* overexpression by performing the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assay, which visualizes the conidial anastomosis (germling fusion) [2], and transcriptional analysis of the cell fusion-related genes. Under overexpression of *Aoste12*, conidial anastomosis was not detected, and the cell fusion-related genes were downregulated. These results suggest that AoSte12 plays not only positive but also negative functions in cell fusion.

Furthermore, we compared the cell fusion-related phenotypes between single (Δ*Aofus3*, Δ*Aoste12*, Δ*fipC*) and double deletions (Δ*Aofus3*Δ*Aoste12*, Δ*Aofus3*Δ*fipC*, Δ*Aoste12*Δ*fipC*) previously constructed [3]. In particular, although complete loss of conidial anastomosis in Δ*Aofus3* was not altered by deleting the other 2 genes, defect of conidial anastomosis in Δ*fipC* was suppressed by further deletion of *Aoste12*. Consistent with this result, downregulation of the cell fusion-related genes in Δ*fipC* was suppressed by further *Aoste12* deletion. These reveal that the cell fusion defect in *fipC* deletion depends on AoSte12, which gives the possibility that FipC represses the negative function of AoSte12 in the regulation of cell fusion.

[1] Katayama *et al.*, Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049 [2] Okabe *et al.*, Annual meeting of JSBBA 2016, 2F053 [3] Mo *et al*., Annual meeting of JSBBA 2016, 2C18p02

Aspergillus oryzae, cell fusion, transcription factor

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A05 会場

Aspergillus 属糸状菌の異なる分化における新規転写因子による制御機構の解析
Functional analysis of novel transcription factors regulating sclerotia formation and sexual reproduction in *Aspergillus* species

○藤井 陽平[1]、中村 英淳[1]、片山 琢也[1]、KARAHODA Betim[2]、BAYRAM Ozgur[2]、小川 真弘[3]、小山 泰二[3]、北本 勝ひこ[4]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]アイルランド国立大学、[3]野田産研、[4]日薬大・薬)
○Yohei FUJII[1], Hidetoshi NAKAMURA[1], Takuya KATAYAMA[1], Betim KARAHODA[2], Ozgur BAYRAM[2], Masahiro OGAWA[3], Yasuji KOYAMA[3], Katsuhiko KITAMOTO[4], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Noda Inst. Sci. Res., [4]Nihon Pharmaceutical Univ.)

【目的】

Aspergillus 属糸状菌の分化は一般に、有性胞子を形成する有性生活環、または分生子と呼ばれる無性胞子を形成する無性生活環が存在する。一方で、*Aspergillus* 属菌の一部では菌糸が接着・融合して無性的に形成される菌核への分化が起こるが、その内部に有性生殖器官を形成することが報告されている。このことから、菌核形成は有性生殖と形態的に関連すると考えられ、さらには、いくつかの有性生殖関連遺伝子は菌核形成に関与することが知られている。我々はこれまでに、有性生殖が見つかっていない麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、新規 $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子 TrsA と TrsB が菌核形成に必要であることを見いだした[1)]。これら 2 つの転写因子は他の *Aspergillus* 属菌にも広く保存されているが、これまでに有性生殖への関与をはじめとして他の機能に関する報告はない。そこで本研究では、TrsA および TrsB による菌核形成と有性生殖における共通の制御機構の解明を目的とした。

【結果】

菌核は形成しないが有性生殖を行う *Aspergillus nidulans* においても、TrsA および TrsB のオルソログが保存されている。これらのオルソログ遺伝子を破壊した結果、閉子嚢殻と呼ばれる有性生殖器官の形成率が低下した。この結果から、*A. oryzae* の TrsA および TrsB が菌核形成に必要であるのに対し、*A. nidulans* においてはそれらのオルソログが有性生殖に関与することが明らかになった。また、*A. oryzae* の *trsA* および *trsB* の破壊株では、*A. nidulans* の有性生殖に関与する *nosA* のオルソログの転写産物量が顕著に減少していた。加えて、*A. nidulans* においても *trsA* および *trsB* のオルソログの破壊により *nosA* の転写産物量が減少することが確認された。これらの結果から、TrsA および TrsB は *Aspergillus* 属菌において共通して *nosA* の発現に関与することが示された。

さらに、糸状菌 *Sordaria macrospora* の *nosA* オルソログである *pro1* は有性生殖だけでなく、細胞融合関連遺伝子の発現に関与することが報告されている。そこで、*A. oryzae* の *trsA* および *trsB* の破壊株において定量 RT-PCR を行った結果、細胞融合関連遺伝子の転写産物量が低下していた。これらのことから、有性生殖に関連する NosA オルソログと同様に、菌核形成に必要な転写因子として同定された TrsA および TrsB が細胞融合関連遺伝子の発現に関与することが示された。

1) 藤井陽平ら 日本農芸化学会 2017 年度大会 2C18p04

Aspergillus oryzae, sexual reproduction, transcription factor

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A05 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の不和合性における HET ドメインタンパク質をコードする遺伝子の機能解析
Functional analysis of HET domain protein genes in heterokaryon incompatibility in *Aspergillus oryzae*

○森 法子[1]、片山 琢也[1]、齊藤 亮太[2]、岩下 和裕[2]、丸山 潤一[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]酒総研)
○ Noriko MORI[1], Takuya KATAYAMA[1], Ryota SAITO[2], Kazuhiro IWASHITA[2], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NRIB)

【背景】
多細胞生物である糸状菌は細胞融合により、遺伝的に異なる 2 つの核が同一細胞内に存在する異核共存体を形成する。一部の株間では異核共存体が死に至るまたは十分な生育ができない不和合性という性質が知られている。株間における特定の遺伝子の配列多型が不和合性の原因となり、なかでも HET ドメイン (Pfam06985) をもつタンパク質をコードする遺伝子 (以下、HET ドメイン遺伝子) が、株間の不和合性の決定に関与する例が複数報告されている。醸造産業で用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* では用途により多くの種類の株が存在するが、我々はこれらにおいて不和合である株の組み合わせが存在することを発見した [1)]。産業上の有用性から様々な株を使用した交配育種を可能にすることは重要であり、このためには不和合性のメカニズムの解明が必要である。そこで本研究では、*A. oryzae* において HET ドメイン遺伝子に着目し、その機能および不和合性への関連を解析した。
【結果】
A. oryzae のゲノムデータベースを検索した結果、野生株 RIB40 において HET ドメイン遺伝子が 44 個存在することがわかった。不和合の組み合わせである野生株 RIB40 と日本酒製造用株 RIB128 について、これらの HET ドメイン遺伝子の塩基配列を比較した。配列の違いが存在した 32 個の遺伝子について、RIB128 株由来の遺伝子を RIB40 株において過剰発現させたところ、生育を著しく低下させる遺伝子 AO090001000078 (*Ao078*) および AO090011000558 (*Ao558*)を見いだした。RIB40 株および RIB128 株において自身の株に由来する *Ao078* 遺伝子を過剰発現させた場合、RIB128 株で RIB40 株由来の *Ao078* 遺伝子を過剰発現させた場合には生育の著しい低下は見られなかった。一方、*Ao558* 遺伝子の過剰発現による生育低下については、株の特異性は認められなかった。*Ao078* 遺伝子の不和合性との関連を検討するために、RIB40 株と RIB128 株において CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集により、*Ao078* 遺伝子の破壊および異なる栄養要求性（ウリジン/ウラシル要求性、アデニン要求性）の付与を行った。取得された株間で栄養要求性の相補を利用した和合性解析を行ったところ、*Ao078* 遺伝子を破壊しても 2 株間での不和合性は解消されなかった。現在、*Ao078* 遺伝子の過剰発現による RIB40 株での生育低下の原因となる塩基配列の特定を行っており、その配列が保存されている他の株についても同様に不和合性の解消を検討する予定である。

1) 岡部ら、2016 年度日本農芸化学会大会 2F053

Aspergillus oryzae, incompatibility, heterokaryon

発表責任者：丸山　潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A05 会場

イネいもち病菌の雌性不稔化の原因因子の探索と交配型決定領域の機能解析
Analyses factors of female sterility and functional of MAT1 (mating-type locus1) in *Pyricularia oryzae*.
○藤ヶ崎 礼夏、小西 高裕、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大院理工・応生）
○AYAKA FUJIGASAKI, TAKAHIRO KONISHI, TAKAYUKI ARAZOE, TAKASHI KAMAKURA (TUS)

イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）は、生活環に有性世代を有する糸状菌である。
しかし単離された大半の株は生活環が無性世代のみで構成される。一部の地域から単離された稔性株は、異なる MAT 領域（mating-type locus1）をもつもの同士が交配をし、有性生殖を行うことが、実験室内において観察されている。
交配の際、MAT 領域が必須であるが、稔性株と雌性不稔性株の間で MAT 領域について比較するとその塩基配列や MAT1 遺伝子の転写量に差異は見出されていない。そこでイネいもち病菌の雌性不稔性に関わる原因因子が真に MAT 領域と無関係であるのか、またその場合には MAT 領域以外のどこにあるのか検証するため、稔性株と雌性不稔性株のゲノム比較を行いたい、と考えた。しかし、本菌は株間で染色体多型が著しいことが知られており、野生株同士のゲノム比較は容易ではないことが予想される。そこで、戻し交配による Near Isogenic Line の作成を行い遺伝的背景を近似させることで解析が可能になると考えた。これにより本菌の雌性不稔性の原因だけではなく交配メカニズムの解明に繋がると考えられる。結果、戻し交配後代株を第 5 世代まで取得することに成功した。次世代シーケンサーを用いた解析については追って発表する。
この戻し交配により雌性不稔性株由来の MAT 領域を持つ雌性稔性株を取得した。つまり雌性不稔性株由来の MAT 領域が正常に機能していることが実験的に立証された。
MAT 領域が本菌の稔性、雌性不稔性の関連がないのならば無性世代の生活環のみで継代されてきた雌性不稔性株の MAT 領域がなぜ機能を有したまま保存されているのか、新たな疑問が生じる。そこで、MAT 領域内遺伝子のノックアウトを行うこととした。しかし、本菌において MAT 領域内遺伝子のノックアウトに成功したという報告はなく、一つの可能性として、MAT 領域には有性生殖以外の生存に必須な機能があるということも考えられる。そこで、2 つの交配型をもつ形質転換体ならば MAT 領域内遺伝子のノックアウトが可能であると考えた。ノックアウトの際、判別が可能なように雌性稔性株（MAT1-α）に雌性不稔性株由来の MAT 領域（MAT1-HMG）が導入された株を作成した。この形質転換体においては、単独の培養で偽子嚢殻の形成が確認できた。
この結果、内在性の MAT 領域内遺伝子がノックアウトされた株は取得されなかった。本菌の MAT 遺伝子の機能はゲノム上の位置により影響を受けている可能性があると考えられる。

Pyricularia oryzae, MAT1, mating-type locus1

発表責任者：藤ヶ崎礼夏（6416638@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2A05a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A05 会場

Localization-based screening identified novel proteins regulating cell-to-cell communication in filamentous fungi

○Md. Abdulla Al MAMUN[1], Takuya KATAYAMA[1], Wei CAO[2], Shugo NAKAMURA[2], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]INIAD, Toyo Univ.)

Background:

Filamentous fungi are classified as multicellular organisms, and cell-to-cell communication regularly depends on the septal pore, which confers exchange of cellular components between the adjacent cells. In the evolutionary line, this type of organism gains some cellular machinery to survive in multicellular nature. Pore gating organelle- Woronin body (WB) plays a critical role in interrupting the cell-to-cell communication and protects the rest of the hyphal cells upon wounding. Some enigmatic questions related to the multicellularity such as whether the cell-to-cell communication involves additional regulators other than WB structural proteins are not completely resolved. Therefore, we performed a localization-based screening to find proteins regulating the cell-to-cell communication using *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus extensively characterized with fungal multicellularity[1)].

Results:

Based on BLAST E-values, proteins specific to Pezizomycotina species such as *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Neurospora crassa* were selected, and the proteins conserved in yeast were not included. To preliminarily perform the localization-based screening, unannotated and functionally unknown categories were preferentially selected. When the candidate proteins were tagged with EGFP at the C-terminal end and expressed in *A. oryzae*, various localization patterns were found, *e.g.* in cellular organelles/at hyphal tip and as punctuate dots/dispersed distribution in the cytoplasm. Furthermore, at least 14 proteins were localized either at the septum or at the septal pore in following manners; (1) both sides of the septum, (2) around the septal pore, and (3) punctuate dots in the cytoplasm but accumulating at the septal pore upon hyphal wounding. We deleted the genes encoding the septum-localizing proteins and assessed the ability to protect the cytoplasm upon hyphal tip bursting induced by hypotonic shock. Some of the deletion strains exhibited the excessive loss of the cytoplasm upon hyphal wounding compared to the wild-type. Therefore, it can be concluded that the present localization-based screening with Pezizomycotina-specific uncharacterized proteins is effective for searching proteins having the important role in cell-to-cell communication of filamentous fungi.

1) Maruyama and Kitamoto (2015) Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation, 169-184.

filamentous fungi, multicellularity, cell-cell communication

発表責任者：Jun-ichi Maruyama（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A05 会場

アカパンカビ NER 関連遺伝子欠損株における光回復能の解析

Analysis of photoreactivation in the NER-related gene defective strain of *Neurospora crassa*

○塚田 耕太郎、一石 昭彦（東洋大 生命科学）
○Kotaro TSUKADA, Akihiko ICHIISHI (Toyo Univ.)

【研究背景・目的】生命の遺伝情報を司る DNA は，環境中で様々な損傷を受け続けている。これらを修復できない場合，突然変異や細胞死へとつながる原因となる。そのため，全ての生物はこれらの損傷に対応するために，多様な DNA 修復機構を獲得してきた。損傷の外的要因として代表的な変異原である紫外線は，隣接するピリミジン塩基同士の共有結合によるシクロブタン型ピリミジンダイマー（cyclobutane pyrimidine dimer：CPD）や，(6-4) 光産物 [(6-4) photoproduct] を誘発することで知られている。アカパンカビ（*Neurospora crassa*）におけるこれらの紫外線損傷 DNA は，ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair：NER），光回復（photoreactivation），第二除去修復（second excision repair）といった 3 つの異なる経路により修復される。アカパンカビにおける光回復は，近紫外光から青色光付近の光エネルギーを利用して，光回復酵素により CPD を直接開裂する修復系であり，他の修復系とは独立して機能すると考えられているが，一部の NER 関連遺伝子（*mus-38*，*mus-44*）の変異，欠損株では光回復の部分的な欠損（partial photoreactivation defect：PPD）が起こることが確認されている。さらに，当研究室においてこれらの株での光回復酵素遺伝子 *phr* の転写量は野生株と差がないことが確認された。これらを踏まえて，本研究では NER 関連遺伝子欠損株への *phr* の導入を行い，光回復酵素の過剰発現による光回復能を測定するとともに，PHR タンパク質の発現量を直接定量することで，NER と光回復の関連性や，PPD の原因の解明を試みた。
【方法】アカパンカビ野生株，光回復欠損株（*Δphr*），NER 欠損株（*Δmus-43*，*Δmus-44*）へ，プロモーター領域を含む *phr* を導入した。これらの株の分生子を回収し，暗条件で 0－400 J/m^2 の紫外線感受性試験及び紫外線照射後の光回復試験を行い，紫外線未照射サンプルをコントロールとして生存率を測定した。
【結果・考察】*Δphr* への *phr* の導入による光回復能は野生株と同程度まで回復し，導入した *phr* が正常に機能していることが確認された。また，野生株での *phr* 過剰発現により，400 J/m^2 の紫外線照射後でも 100%に近い高い光回復能を示した。*Δmus-43* と *Δmus-44* では暗条件では共に紫外線に対して高い感受性を示す一方で光回復能には差が見られ，*Δmus-44* では PPD が確認された。それぞれの株で *phr* を過剰発現させた結果，*Δmus-43* では光回復能が導入前よりも上がったが，*Δmus-44* では光回復能は全く改善されず，導入前と同様に PPD が確認された。これらの結果は，*mus-44* の欠損により NER 経路が途中で止まることで，損傷部位に残った NER 酵素複合体が光回復酵素による修復を阻害している可能性を示唆している。また，*Δphr* は暗条件では野生株よりも紫外線に若干の耐性を示す結果が得られたことから，NER と光回復が損傷部位で競合していることが示唆された。現在，導入した *phr* のタンパク質発現量解析を行うとともに，PHR と MUS-44 においてタンパク質間相互作用がないことを確認するため，系統的に離れた種である大腸菌の光回復酵素を導入したアカパンカビの表現型解析を行っている。

DNA repair, photoreactivation, NER

発表責任者：塚田 耕太郎（kotaro.t_0411@outlook.jp）

講演番号：2A05a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A05 会場

糸状菌におけるミトコンドリア局在性 Superoxide dismutase (Mn-SOD)の機能的役割

Function of mitochondrial superoxide dismutase in *Aspergillus nidulans*

○前田 祐未子、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫 (名大院　生命農)
○Yumiko MAEDA, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

（目的）

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、活性酸素種であるスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)を過酸化水素(H_2O_2)に変換する重要な酵素である。生物には一般的に、異なる金属イオンをコファクターにもつ SOD が細胞内の異なる場所に局在して機能分担を行っている。真核生物のミトコンドリアでは、電子伝達経路からリークした電子と酸素が反応して$O_2^{\cdot-}$が発生すると TCA サイクルやアミノ酸合成を司る酵素が不活性化されるなど、ミトコンドリアの恒常性維持に影響する可能性がある。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミトコンドリアマトリックスに局在する SOD(Mn-SOD)に着目した。Mn-SOD の欠損株の機能変化を解析し、ミトコンドリアの酸化ストレス防御が *A. nidulans* の正常な生育に重要であることを明らかにする。

（結果）

本研究では、まず *A. nidulans* の Mn-SOD をコードする *sodB* 遺伝子の破壊株（*ΔsodB*）を構築し、破壊による ROS の発生を顕微鏡下で観察した。ミトコンドリアで発生した ROS を特異的に検出する蛍光プローブ(Mito Sox Red)で染色したところ、破壊株のミトコンドリアにおいて、局所的に ROS が発生していた。*sodB* 破壊によるミトコンドリア機能への影響については、精製ミトコンドリアの量やミトコンドリアタンパク質のカルボニル化、さらにはチトクローム C オキシダーゼ活性や ATP 合成量の変化で検証した。寒天培地上での生育については、*ΔsodB* 株は野生株と同程度の菌糸伸張を示したが、形成される分生子数が *ΔsodB* 株では野生株の 3 分の 1 程度まで低下した。回収した分生子を寒天培地に塗布し 3 日間培養すると、野生株は 65~70%の回復率（発芽率）を示すのに対して、*ΔsodB* 株では 20～30%にまで発芽率が低下した。これらの結果は、Mn-SOD が正常な分生子形成に重要であることを示唆する。酸化ストレス培地での生育への影響も検討した。1.5 mM の過酸化水素による生育への影響は野生株と同程度であった。一方、5μM のメナジオンに対して野生株は耐性を示すのに対して、*ΔsodB* 株は感受性を示した。メナジオンはミトコンドリア電子伝達系複合体 I の機能を低下させるが、*ΔsodB* 株のミトコンドリア機能低下がメナジオン感受性を引き起こした可能性が考えられた。以上の結果から、Mn-SOD によるミトコンドリア機能の恒常性が糸状菌の正常な生育に重要であることが明らかになった。

mitochondria, superoxide dismutase, *Aspergillus nidulans*

講演番号：2A05a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A05 会場

糸状菌分泌型ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) の持つ PLA_1 活性と生理機能の解析
Analysis on the phospholipase (PL) A_1 activity of fungal secretory PLA_2s and their physiological function

○笹原 大志[1]、宮川 拓也[2]、大塚 淳[2]、吉野 龍ノ介[1]、寺田 透[1,3]、田之倉 優[2]、有岡 学[1] ([1]東大院　農生科　応生工、[2]東大院　農生科　応生化、[3]東大院　農生科　アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット)
○Taishi SASAHARA[1], Takuya MIYAKAWA[2], Jun OHTSUKA[2], Ryunosuke YOSHINO[1], Tohru TERADA[1,3], Masaru TANOKURA[2], Manabu ARIOKA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]Dept. of Agricultural Bioinformatics Research Unit, The Univ. of Tokyo)

【背景】ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を特異的に加水分解する酵素であり、アミノ酸配列や局在、カルシウム依存性などから分泌型 (secretory PLA_2; $sPLA_2$)、細胞質型、カルシウム非依存型などに大別される。$sPLA_2$ は脂質メディエーターの産生に関わることから動物において盛んに研究されているが、微生物ではモデル生物である酵母が $sPLA_2$ 遺伝子を持たないため知見が乏しい。我々は以前麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの $sPLA_2$ オルソログである sPlaA と sPlaB について酵素学的性質の解析を行う中で、sPlaA が予想通り PLA_2 活性を示すのに対し、sPlaB が PLA_2 ではなく *sn*-1 位のエステル結合を加水分解するホスホリパーゼ A_1 (PLA_1) であることを見出した。PLA_1 活性を示す $sPLA_2$ はこれまで知られておらず、sPlaB が初の報告である。この結果について、分子モデリングや変異 sPlaA、sPlaB を用いた解析を行ったところ、活性中心付近の R100 (sPlaA) と Q94 (sPlaB) の違いが PLA_2/PLA_1 活性の違いに寄与することが示唆された。そこで本発表では、sPlaB 以外にも PLA_1 活性を示す $sPLA_2$ オルソログが存在するかを調べた。また、$sPLA_2$ の生理的な役割を明らかにするため、*A. oryzae* における遺伝子破壊株を作製し、表現型を解析した。

【結果と考察】様々な糸状菌由来の $sPLA_2$ オルソログについて、sPlaA/sPlaB における R100/Q94 と相同の位置のアミノ酸残基を調べた。その結果、*Magnaporthe oryzae* の持つ 2 つ、及び *Trichoderma reesei* の持つ 1 つの $sPLA_2$ オルソログがこの位置に sPlaB と同じく Q 残基を持つことがわかった。そこでこれらについて大腸菌を用いて組換えタンパク質を生産・精製し、質量分析計を用いた酵素活性測定を行った。その結果、3 つの酵素ともリン脂質を分解して 2-アシルリゾリン脂質を生成すること、すなわちこれらが PLA_1 であることがわかった。この「$sPLA_2$ オルソログが示す PLA_1 活性」の構造的基盤を明らかにするため、現在、これまでに取得した $sPLA_2$ の中で最も生産量が多かった *T. reesei* 由来の $sPLA_2$ オルソログについて結晶化を試みている。一方、$sPLA_2$ の生理的役割を明らかにするため、*A. oryzae* における $sPLA_2$ 遺伝子単独、二重破壊株を *pyrG* マーカーリサイクリング法を用いて取得した。現在、栄養制限条件や様々なストレス条件での生育測定を行っている。また、sPlaB が PLA_1 活性を示すことから、*A. oryzae* が持つ 2 つの分泌型 PLA_1 オルソログ、及びグリセロリン脂質の *sn*-1 位、*sn*-2 位の両方のエステル結合を加水分解するホスホリパーゼ B (PLB) オルソログについての遺伝子破壊株取得も進めている。

phospholipid, filamentous fungi, regiospecificity

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A05 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析

Analysis on physiological functions of oryzapsins in *Aspergillus oryzae*.

○片桐 珠希、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大農・応生化）
○Tamaki KATAGIRI, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】

Saccharomyces cerevisiae の、Kex2p 欠損株の表現型を回復させるタンパク質として yapsin family の存在が明らかになった。yapsin は GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼであり、YPS1、YPS2、YPS3、YPS6、YPS7 の 5 つの酵素が yapsin family であると考えられている。厳密な基質特異性は異なるが、これらの yapsin family プロテアーゼは塩基性アミノ酸の C 末端側のペプチド結合を特異的に切断し、GPI アンカーにより細胞膜に結合している。欠損株を用いた機能解析により、*YPS* 単独欠損株と野生株との間に表現型の差異は見られないが、*YPS1*, *YPS2* 二重欠損株が高温感受性を示すこと、五重破壊株では細胞壁攪乱剤への感受性が上昇することが示されている。また、*YPS1* および *YPS2* 欠損株を宿主として異種タンパク質を発現させると、宿主由来プロテアーゼによる分解が抑制されて生産量が増加することが報告されている。

2005 年に完了した黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム解析により、yapsin-like protein である oryzapsin をコードする 3 つの遺伝子（*opsA*, *opsB*, *opsC*）が推定された。このうち、*opsC* は偽遺伝子であると考えられた。OpsA および OpsB は、yapsin 同様 GPI アンカー型 APase であることや、酵母 yapsin との基質特異性の違い等が示唆されている。しかし、未だ *A. oryzae* における生物学的機能は明らかになっていない。そこで本研究では、*opsA*、*opsB*、*opsC* の各単独欠損株と *opsA*, *opsB* 二重欠損株の作製を行い、これらを用いた oryzapsin の機能解析を行った。

【方法と結果】

oryzapsin 欠損株は、*A. oryzae* RIB40 Δ*ligD*Δ*pyrG* 株をホストに、*pyrG* をマーカー遺伝子とした破壊用カセットとの相同組換えにより作製した。カセットはマーカーのリサイクリングのため、選択培地に播種することでループアウトが可能となるよう設計し、カセットループアウト後、形質転換のため破壊していた *ligD* と *pyrG* を *ligD* ローカスに復帰させることで oryzapsin のみを欠損した株を作製した。形質転換により得られた株は、サザンブロッティングにより目的のものであることを確認した。

破壊株の表現型観察の結果、yapsin の場合と異なり *opsA*, *opsB* 二重欠損による高温感受性は観察されなかった。また、細胞壁合成攪乱剤や微小管重合阻害剤により生育に影響が現れたことから、oryzapsin が細胞壁生合成や微小管重合に関与する可能性が示唆された。

Aspergillus oryzae, protease, functional analysis

講演番号：2A05a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A05 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるアクティベーションタグを用いた遺伝子機能解析法の開発
Development of gene functional analysis by use of activation tag in *Aspergillus oryzae*
○森 絢美[1]、井上 樹[2]、松岡 太郎[1]、徳岡 昌文[2]、進藤 斉[2]、穂坂 賢[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Ayami MORI[1], Itsuki INOUE[2], Taro MATSUOKA[1], Masafumi TOKUOKA[2], Hitoshi SHINDO[2], Masaru HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】
アクティベーションタギング法は、エンハンサー配列を含む DNA タグをゲノムにランダムに導入し、近傍遺伝子を強制発現させることで、表現型変化と遺伝子導入箇所から遺伝子機能を推定する手法である。既知情報に頼らずに新規遺伝子機能の発見が可能であることから、優れた遺伝子機能解析法であるが、糸状菌においては解析技術が確立されていない。本研究では、麹菌のアミラーゼ系遺伝子のエンハンサー配列を利用したアクティベーションタギング法の開発を目指して検討を行ったので報告する。
【方法及び結果】
初めにアミラーゼ系遺伝子のエンハンサー配列がプロモーター内において下流遺伝子を活性化できる領域を GUS 解析により調べた。酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA*、解糖系エノラーゼ遺伝子 *enoA* のプロモーター領域への導入実験から、用いたエンハンサー配列は翻訳開始点の 1,500～2,000bp 上流においても遺伝子の活性化能があることが分かった。そこで *sC* マーカー配列の両側に *enoA* 遺伝子上流領域及びエンハンサー配列を連結したアクティベーションタギング用の DNA タグを作製した。次にランダムな遺伝子活性化によるトキシン生産を避けるため、アフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスター全長が欠失した *A. oryzae* RIB143 株の *sC*$^-$ 株を作製し、麹菌宿主とした。
作製した DNA タグと宿主株を用いてプロトプラスト法により形質転換を行ったところ、DNA タグの導入株を取得することができた。現在、表現型の解析や DNA タグのゲノム導入位置の特定、導入箇所周辺遺伝子の発現を調べている。

Aspergillus oryzae, activation tagging, insertional mutagenesis

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：2A05a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A05 会場

ゲノム編集時に引き起こされる麹菌 *Aspergillus oryzae* の大規模欠失機構に関する研究

Elucidation of large deletions mechanism mediated by genome editing using TALENs and CRISPR/Cas9 in *Aspergillus oryzae*

○水谷 治[1]、林 梨咲[2]、渡嘉敷 直杏[1]、上里 優希[1]、上元 優[1]、玉井 萌子[1]、荒添 貴之[3]、山田 修[2]、外山 博英[1] ([1]琉球大農、[2]酒総研、[3]東京理科大理工)

○Osamu Mizutani[1], Risa Hayashi[2], Jikian Tokashiki[1], Yuki Uezato[1], Yu Uemoto[1], Moeko Tamai[1], Takayuki Arazoe[3], Osamu Yamada[2], Hirohide Toyama[1] ([1]Univ. of Ryukyus, [2]NRIB, [3]Tokyo Univ. Sci.)

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は古くから醸造・発酵現場で用いられている産業微生物である。我々は、麹菌におけるゲノム編集による育種の可能性を調べる中で、糸状菌用高活性 TALENs（Platinum-Fungal TALENs：PtFg TALENs)[1] を用いて、非相同末端結合（Nonhomologous end joining：NHEJ）による修復エラーを介したコンストラクトでゲノム編集を行うと、ゲノム編集による欠失株の約半分程度が 1 kb 以上の大規模欠失であることを見出している [2]。従来、酵母や他の高等生物では、NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行うと、数 bp の欠失が起きるのが一般的である。そのため、この大規模欠失は、麹菌を含む糸状菌に特有な機構であることが示唆される。そこで本研究では、麹菌において、なぜゲノム二本鎖切断時にこのような大規模欠失を伴った修復エラーが起きるのかを明らかにすることを目的としている。

まず始めに、他の *Aspergillus* 属における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集では、大規模欠失の報告はされていない。これは、CRISPR/Cas9 による切断が平滑末端であり、TALENs との切断様式と異なるため、大規模欠失の有無に繋がるかもしれないと考えられた。そこで、この仮設を検証するために、麹菌において CRISPR/Cas9 を用いて、PtFg TALENs 使用時と同様なコンストラクトでゲノム編集を行った。CRISPR/Cas9 の導入は、Cas9 とガイド RNA 複合体を麹菌プロトプラストに直接導入する方法を用いた。その結果、PtFg TALENs を用いた時と同様に、大規模欠失が観察され、切断様式は大規模欠失に影響がないことが示唆された。また、我々は、NHEJ 経路の最終反応である DNA 末端結合に関与する ligase である *ligD* 遺伝子破壊株を宿主に、同様にゲノム編集を行うと、野生株で観察された大規模欠失が、*ligD* 破壊株では部分的に抑制されることも見出している [2]。そこで現在、大規模欠失における *ligD* 遺伝子の関与を調べるために、*ligD* 遺伝子の高発現株の造成を行い、ゲノム編集による大規模欠失の増加が、野生株と比較して引き起こされるかを検討している。

1). Arazoe T et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 112(7):1335-1342, 2015
2). Mizutani O et al., *J. Biosci. Bioeng*. 123(3):287-293, 2017

TALENs, CRISPR/Cas9, Aspergillus oryzae

発表責任者：水谷　治（mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2A05a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A05 会場

分裂酵母における胞子成熟に関わる遺伝子の取得と解析
Isolation and analysis of fission yeast genes involved in spore maturation
○張 博文、増田 風子、中村 太郎（大阪市大院理）
○Bowen ZHANG, Fuko MASUDA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

＜目的＞
分裂酵母 *S. pombe* は栄養源が枯渇した環境下で、接合と減数分裂を伴って、胞子を形成する。胞子は、熱や有機溶媒、消化酵素などの様々なストレスへの耐性を持っている。胞子細胞膜の前駆体である前胞子膜は、内膜と外膜からなる二重膜である。この2つの膜の間に、胞子壁の材料となる成分が集まり、胞子壁が形成される。その後、前胞子膜外膜は分解し、内膜は胞子細胞膜になって、胞子が完成する。本研究は、胞子壁形成の中でとくに前胞子膜外膜の分解に関わる遺伝子の取得と解析により、胞子成熟の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

＜結果＞
昨年の本会で、我々は、前胞子膜外膜の分解に欠損が見られる *spoE22* 変異株を取得したことを報告した。変異点を調べたところ、*meu5*$^{+}$の第2イントロンに変異が見られ、そのスプライシングが欠損していた。ウエスタン解析により、*spoE22* 変異株では正常な Meu5 タンパク質が合成できないことが分かった。Meu5 は mRNA 結合タンパク質であり、少なくとも80以上の標的遺伝子を持っている。Meu5 は、それら標的遺伝子の mRNA の安定化に関わっていることが知られている。
さらに、Ada2 や Gcn5 など、SAGA 複合体構成因子欠損株においても前胞子膜の外膜分解が欠損していることを発見した。SAGA 複合体は、転写制御などさまざまな機能をもっていることが知られている。*ada2*$^{+}$や *gcn5*$^{+}$は Meu5 の直接的なターゲットではないことから、Meu5 と SAGA 複合体は、独立して前胞子膜外膜の分解過程に関わっていると考えられる。現在、Meu5 と SAGA 複合体のターゲット遺伝子の取得を試みている。

yeast, sporulation, membrane

講演番号：2A05a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A05 会場

分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に必須な機能未知のタンパク質 Spo45 の解析

Characterization of Spo45 essential for the initiation of forespore membrane formation in fission yeast

○新美 柊子、中村 太郎（大阪市大院理）
○Touko NIIMI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【背景・目的】

分裂酵母は栄養飢餓条件下で娘細胞である胞子を形成する。この時、動物細胞の中心体に相当するスピンドル極体（SPB）を起点として胞子の細胞膜が形成される。このような中心体を起点とした細胞膜形成は、動物細胞の一次繊毛形成など、他の生物でもみられる興味深い現象である。胞子細胞膜形成の開始に先立ち、Spo2 や Spo15 などのタンパク質が SPB の細胞質側に局在することが知られている（以下、SPB 因子）[1), 2)]。これまで SPB 因子はいくつか取得されてきたが、胞子細胞膜形成開始の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。我々が取得した Spo45 は、胞子細胞膜形成開始に必須な新規の遺伝子であり、栄養増殖と胞子形成の両時期で発現している（2015 年度大会）。また、Spo45 は SPB や核膜に局在すること、SPB 因子の正常な局在に必須であることなどをこれまで明らかにした（2016 年度大会）。本研究では Spo45 の解析を通して胞子細胞膜形成の開始の分子メカニズムを解明することを目的とする。

【方法・結果】

(1) Spo45 の膜貫通領域の役割: *spo45* の膜貫通領域を欠失させたもの（*spo45ΔTM*）と膜貫通領域のみ（*spo45TM*）を発現させた 2 種類の変異遺伝子を作製した。蛍光顕微鏡による観察では、GFP-Spo45ΔTM は SPB に局在できないが GFP-Spo45TM は SPB と核膜の両方に局在がみられた。また、これらの変異株において SPB 因子の 1 つである Spo15-mCherry の局在を観察したところ、SPB に局在できなくなっていた。また、どちらの変異株においても正常な胞子は形成されなかった。これらの結果から、Spo45 は膜貫通領域を介して SPB に局在し、N 末端側領域で Spo15 などの SPB 因子を留めることにより、胞子細胞膜形成を開始させると考えられる。

(2) Spo45 と結合するタンパク質の取得: Spo45 と物理的に相互作用する因子を取得するために SPB に局在する様々なタンパク質と酵母ツーハイブリッド法を行ったところ、ペリセントリン Pcp1 との結合がみられた。現在、分裂酵母内で両タンパク質が結合しているかを調べているところである。

【References】

1. Ikemoto *et al.* J. Cell. Sci. 113: 545-554 (2000)
2. Nakase *et al.* Mol. Biol. Cell. 19: 2476-2487 (2008)

yeast, membrane, centrosome

講演番号：2A05a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A05 会場

分裂酵母胞子の最外タンパク質層構築に関連する因子の同定と解析

Identification and analysis of factors involved in outermost layer construction of fission yeast spores

○酒井 崇史[1]、田原 悠平[1,2]、宮田 真人[1,2]、中村 太郎[1]（[1]大阪市大院理、[2]大阪市大複合先端研究機構）
○Takafumi SAKAI[1], Yuhei TAHARA[1,2], Makoto MIYATA[1,2], Taro NAKAMURA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA)

【背景と目的】　分裂酵母の胞子は、様々なストレスに耐性を持つ休眠細胞である。我々はこれまでに、分裂酵母の胞子壁最外層が Isp3 と呼ばれるタンパク質で構成されており（Isp3 層）、この層が熱やアルコールなどの環境ストレスに対する胞子の耐性に重要な役割を果たすことを明らかにしている [(1)]。また、電子顕微鏡下では、Isp3 層はスジ状の構造がランダムに重なる層として観察される。Isp3 は、形成中の胞子の細胞質で発現・蓄積した後に、胞子の外へと輸送され、胞子壁表面に集合して層を形成すると考えられる。しかし、その過程の詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究は、Isp3 層構築に関わる因子を同定・解析し、その構築の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

【結果】　我々は、Isp3 層構築に関わる因子として、パルミトイル転移酵素の触媒サブユニットである Mug142 と、調節サブユニットである Mug91 を同定した。これらは、Isp3 のパルミトイル化に関わることが報告されている [(2)]。これまでに、*mug142Δ* の単離胞子において、Isp3 がほとんど存在していないこと、また、胞子形成過程において *mug142Δ* では Isp3 が野生型株と同様に胞子外へと輸送されるが、胞子表層への局在が不完全となることを明らかにし、パルミトイル化が Isp3 層構築に重要であると予想した。

今回、Isp3 の胞子表面への局在に関わるパルミトイル化部位の特定を試みた。パルミトイル化のターゲットであるシステイン残基は、Isp3 に 10 存在する。そこでシステインをそれぞれセリンに置換して局在を観察したところ、7 番目のシステインを置換した Isp3 タンパク質（$Isp3^{C7S}$）のみ、胞子表面に局在できなかった。さらに、電子顕微鏡観察では、*mug142Δ* および *isp3-C7S* 変異株の胞子表面において、*isp3 Δ* と同様にスジ状の構造がみられなかった。

これらのことから、Isp3 のパルミトイル化が Isp3 層構築に必要であると考えられる。現在は、Isp3 のパルミトイル化がどのように層構築に関わるのかさらなる解析を進めている。

1. Fukunishi et al., Mol. Biol. Cell 25: 1549-1559 (2014)
2. Zhang MM et al., PLoS Biol 11: e1001597 (2013)

yeast, cell wall, lipid

講演番号：2A05a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A05 会場

超好熱性アーキアの硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の同定
Identification of ubiqutine-like protein involved in sulfur transfer in a hyperthermophilic archaeon
○秀瀬 涼太、榊原 早津季、藤原 伸介（関学大院理工）
○Ryota HIDESE, Satsuki SAKAKIBARA, Shinsuke FUJIWARA (Kwansei Gakuin Univ.)

【目的】あらゆる生物において、モリブドプテリンや鉄硫黄クラスターなど含硫補因子や tRNA のチオ化修飾は生命維持に寄与している。常温生物では、システインデスルフラーゼ（CDS）の作用により L-システインから脱離する硫黄が、これら含硫化合物への硫黄転移に使われる。一方、初期生命の性質を強く残している超好熱性アーキアの多くは、CDS オルソログをもたず、これら含硫化合物の生合成系は不明である。これまでに、*Thermococcus kodakarensis* の CDS は鉄硫黄クラスターの生合成に必須であること [1]を明らかにしたが、モリブドプテリン生合成や tRNA のチオ化修飾の硫黄転移を含めた全容は不明である。本研究では、*T. kodakarensis* の硫黄転移のキャリアーと考えられるユビキチン様タンパク質オルソログに着目した。
【結果・考察】含硫化合物への硫黄転移系では、ユビキチン様タンパク質が関与することが大腸菌や好塩性アーキア [2]などで知られている。また、アーキアにおいて、ユビキチン様タンパク質は硫黄転移だけでなく、プロテアソーム系に関与することが明らかになっている。*T. kodakarensis* は、3 種のユビキチン様タンパク質オルソログ（TK1065, TK1093, TK2118）を有していた。それぞれのオルソログの機能を調べるために、特異的遺伝子破壊を試みた。その結果、TK1065 及び TK2118 遺伝子破壊株を得た一方、TK1093 遺伝子破壊株は取得できなかった。得られた遺伝子破壊株を、マルトオリゴ糖含有栄養培地での生育特性を解析した結果、TK2118 破壊株がマルトオリゴ糖含有栄養培地で生育しなかった。また、TK2118 破壊株にトランスに TK2118 遺伝子を作用させた株は、本培地にて野生株と同等に生育した。*T. kodakarensis* はマルトオリゴ糖を炭素源として資化でき、その資化経路にはグリセロアルデヒド-3-リン酸：フェレドキシン酸化還元酵素が働く [3]。本酵素は、活性発現にモリブドプテリンを要求する。つまり、TK2118 はモリブドプテリンの生合成に関与していることが示唆された。次に、TK1065 または TK2118 遺伝子破壊株を、野生株の至適生育温度（85℃）及び高温ストレス環境（93℃）で培養したところ、TK1065 遺伝子破壊株はいずれの温度でも野生株と比べて同等に生育した一方で、TK2118 遺伝子破壊株は 93℃で著しい生育遅延を示した。tRNA のチオ化修飾は、好熱菌の高温での生育に重要であると考えられるため、TK2118 はモリブドプテリン生合成の関与だけでなく、tRNA のチオ化修飾に関わると予想され、硫黄転移の“ハブ”として機能していることが考えられた。1) Hidese et al., Mol. Microbiol., 93:331-45 (2014); 2) Miranda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 15;108:4417-22 (2011); 3) Matsubara et al., Mol Microbiol., 81:1300-12 (2011).

Archaea, Ubiquitin-like protein, Sulfur-containing biofactor

発表責任者：秀瀬涼太（rhidese@kwansei.ac.jp）

講演番号：2A05p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A05 会場

超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* におけるキチナーゼ遺伝子破壊株の解析
Characterization of chitinase gene deletion mutants of hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*
○山田 将大、中田 菜月、MEHWISH Aslam、金井 保、跡見 晴幸（京大院工）
○Masahiro YAMADA, Natsuki NAKADA, Aslam MEHWISH, Tamotsu KANAI, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

(目的・背景)

超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus*（以前の名称は *Thermococcus chitonophagus*）はキチンを主な有機物源とした培地により生育可能であり、３つのキチナーゼ遺伝子をもつ。*Pc*-ChiA は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* ChiA のホモログであり、異なる触媒活性を示す２つのキチナーゼドメインを有する。*Pc*-ChiC は膜結合ドメインをもつ酵素である。*Pc*-ChiD は新規な触媒ドメインをもち、キチンを還元末端側から切断する酵素である。本研究では、キチン分解における各キチナーゼの分子機構の解明を目的として、*P. chitonophagus* の遺伝子組換え系の構築および各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を目指した。

(方法・結果)

P. chitonophagus の遺伝子組換え系は、*T. kodakarensis* の遺伝子組換え系を参考に構築を進めた。*T. kodakarensis* の系では *pyrF* をマーカー遺伝子として用いた系が用いられている。ピリミジン生合成に関与する *pyrE* や *pyrF* は、その遺伝子破壊株が示すウラシル要求性および 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性により、遺伝子組換え系のマーカー遺伝子としてしばしば用いられる。我々は 5-FOA 耐性を指標として、*P. chitonophagus* の *pyrE* 破壊株の単離を試みた。その結果、ウラシル要求性と 5-FOA 耐性を示す CHU1 株が得られ、本菌において *pyrE* の大部分が欠損している一方で、*pyrF* には変異が無いことを確認した。次に CHU1 株をホスト株として用いて、各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を試みた。３種のキチナーゼ遺伝子（*chiA*, *chiC*, *chiD*）に対して *pyrE* を含む遺伝子破壊ベクターをそれぞれ構築し、これらを用いてシングルクロスオーバー相同組換え（pop-in）と相同組換えによる *pyrE* の除去（pop-out）による遺伝子破壊を進めた。その結果、*chiC* と *chiD* の破壊ベクター（30 μg）を添加した場合にウラシルを含まない培地での生育が確認され、遺伝子破壊ベクターのゲノム内への導入が示唆された。続いて、0.1%（w/v）5-FOA を含む液体培地で複数回継代培養することで、*chiC* と *chiD* の遺伝子破壊株が培地中で濃縮されていることを確認した。その後、固体培地を用いて、*chiC* 破壊株（CHDC1 株）と *chiD* 破壊株（CHDD1 株）をそれぞれ単離することに成功した。

chitinase, archaea, transformation

講演番号：2A05p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A05 会場

Sphingobium sp.SYK-6 株における鉄取り込みに関与する遺伝子の同定
Identification of genes involved in iron uptake in *Sphingobium* sp. strain SYK-6
○佐久本 太一、藤田 雅也、森 光佑、于 宏洋、上村 直史、政井 英司 (長岡技科大・生物)
○Taichi Sakumoto, Masaya Fujita, Kosuke Mori, Hong Yang Yu, Naofumi Kamimura, Eiji Masai (Nagaoka Univ.)

【緒言】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、植物細胞壁の主要成分であるリグニンに由来する様々な二量体及び単量体芳香族化合物を単一炭素源・エネルギー源として生育するα-proteobacteria である。当研究グループはこれまでに本株のリグニン由来化合物代謝に関わる酵素遺伝子の大部分を明らかにしてきた。一方でリグニン由来化合物の細胞内への取り込みや代謝に必須な微量成分の獲得機構についてはほとんど分かっていない。特に鉄イオンは芳香環開裂や脱メチルを触媒するオキシゲナーゼの活性中心に含まれることから、リグニン由来化合物の代謝に不可欠である。グラム陰性菌における鉄獲得機構は *Pseudomonas aeruginosa* 等のγ-proteobacteria に属する病原菌で多く報告されており、外膜においては主に内膜局在性の TonB-ExbB-ExbD 複合体から伝達されるプロトン駆動力を利用して物質を輸送する TonB-dependent receptor (TBDR)が、内膜では ATP-binding cassette transporter (ABC transporter)または ferrous iron transporter (Feo)が鉄輸送を担うことが示されている。一方、α-proteobacteria では Rhizobiales 目細菌において TBDR と ABC transporter、Feo が鉄獲得を担うことが明らかにされているが、Sphingomonadales 目では報告がない。本研究では SYK-6 株における鉄獲得に関与する輸送体遺伝子の同定を目的とした。

【方法・結果・考察】SYK-6 株のゲノムから既知の鉄輸送 TBDR とアミノ酸配列相同性の高い 8 つの遺伝子と Feo 複合体の膜輸送成分と相同性を示す *feoB* を選抜し、遺伝子破壊株を作製した。これら破壊株に加え、既に構築済みの 5 つの *tonB* (*tonB2~B6*)破壊株のバニリン酸(VA)及びシリンガ酸(SA)での生育能を調べた。その結果、TBDR 遺伝子の一つである *fiuA*、*tonB2*、*feoB* の各破壊株では野生株と比較して VA、SA 両化合物での生育が顕著に遅延した。また鉄キレート剤である 2,2′-ビピリジル(DIP)を 100 μM 添加した鉄制限条件下においては、VA、SA における生育が更に遅延した。これらの結果から、SYK-6 株の鉄輸送には、外膜においては FiuA と TonB2 が関わる TonB システムが、内膜では FeoB が関わる Feo 複合体が関与することが推察された。一方、グラム陰性菌において多くの鉄獲得系遺伝子の転写は鉄制限条件下で誘導されることから、鉄制限条件下における *fiuA*、*tonB2*、*feoB* の転写誘導性を評価した。各遺伝子の推定プロモーター領域を *lacZ* 上流に挿入したプラスミドを導入した SYK-6 株を DIP 存在下、非存在下で培養後、β-ガラクトシダーゼ活性を指標としてプロモーター活性を測定した。その結果、DIP 添加条件では *fiuA*、*tonB2*、*feoB* のプロモーター活性が 3～4 倍に増大したことから、これら遺伝子の転写が鉄制限条件下で誘導されることが示唆された。

Sphingobium, membrane transport, TonB system

講演番号：2A05p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A05 会場

リグニン由来アセトフェノン誘導体に作用する多成分カルボキシラーゼシステム

Characterization of a multi-component enzyme system responsible for carboxylation of a lignin-derived acetophenone analog

○竹浪 寛樹、樋口 雄大、上村 直史、政井 英司（長岡技科大工）
○Hiroki TAKENAMI, Yudai HIGUCHI, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来二量体及び単量体化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。リグニン中の分子間結合のうち、β-aryl ether 結合は約 50%を占める主要な結合であり、本結合の開裂とその後の代謝は自然界におけるリグニン生分解において重要なプロセスであると考えられる。SYK-6 株において、β-aryl ether のモデル化合物である guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether (GGE) はエーテル開裂を受け、生成するβ-hydroxypropiovanillone は vanilloyl acetic acid (VAA) へと酸化され vanillic acid を経由して代謝される (樋口ら，2016 年度本大会)。しかし、本経路において VAA は部分的に非酵素的な脱炭酸を受け acetovanillone (AV)を生じることが示唆されている。2014 年度の本大会において、AV は VAA にカルボキシル化されて代謝されること、本反応に関わると推定される *acvABCDEF* 遺伝子群を見出したことを報告した。本研究では、SYK-6 株の AV 変換における各 *acv* 遺伝子の関与と機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】5 mM GGE または AV の存在・非存在下で培養した SYK-6 株と各 *acv* 遺伝子破壊株の休止細胞を用いて AV 変換実験を行った。*acvABCDEF* を有するプラスミドを導入した *Sphingobium japonicum* UT26S 株の休止細胞を用いて AV 変換実験を行った。*acvA* と *acvB* をそれぞれ発現させた *E. coli* の細胞抽出液を用いて AV 変換実験を行なった。基質変換と反応産物は LC-MS 分析により調べた。
【結果と考察】各 *acv* 遺伝子破壊株の AV 変換能を調べたところ、*acvA~acvE* の各破壊株は AV 変換能を欠損したが、*acvF* 破壊株は野生株と同等の変換能を示した。これらの結果から、AV 変換には *acvA~acvE* が必須であり、*acvF* は必須ではないことが示唆された。AV カルボキシル化に必要な成分を明らかにすることを目的として、AV 変換能を持たない *S. japonicum* UT26S 株を宿主に用いて *acvABCDEF* を発現させ、AV 変換能を評価した。その結果、AV の減少と VAA の顕著な蓄積が観察され、*acvABCDEF* の遺伝子産物により AV がカルボキシル化されたことが強く示唆された。各 *acv* 遺伝子のアミノ酸配列相同性から *acvAB*、*acvF*、*acvCDE* はそれぞれ phenylphosphate synthase、phenylphosphate phosphatase、biotin-dependent carboxylase の各成分をコードすることが推定された。各遺伝子の機能を明らかにするため、*acvA* 及び *acvB* をそれぞれ *E. coli* で発現させ、AV 変換実験を行った。その結果、リン酸化 AV と推定される化合物の生成が観察され、AcvAB が AV のリン酸化を触媒することと、AV がリン酸化を経てカルボキシル化を受けることが示唆された。現在、*acvF* と *acvCDE* の機能解析を行っている。

acetovanillone, carboxylase, *Sphingobium*

講演番号：2A05p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A05 会場

染色体パッセンジャー複合体は環状染色体の維持に必要である
Chromosome passenger complex is required for the maintenance of circular chromosome
○上野 勝、ハビブ アハメド (広大)
○Masaru UENO, Ahmed Habib (Hiroshima Univ.)

ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高い頻度(異型脂肪腫様腫瘍で８５％)で環状染色体が見つかる。また先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者は、発達異常がみられるだけでなく、環状染色体は不安定で環状染色体を失うとがんのリスクが上がることも報告されている。しかし、環状染色体が線状染色体とどのような点で違うのかは、十分にはわかっていない。

分裂酵母のテロメア結合因子 pot1+を破壊すると全ての染色体が環状化した株が生き残る。この環状染色体を持った株の生育に必須な遺伝子を探索した結果、染色体パッセンジャー複合体の変異が pot1+の破壊と合成致死になることを発見した。染色体パッセンジャー複合体は、Cut17/Bir1、Ark1、Pic1、Nbl1 から構成されており、染色体分配において重要な役割を果たし、生育に必須である。温度感受性株である cut17-275、bir1-T1、ark1-T7、 ark1-T8 株は、許容温度（２５oC）で pot1 破壊と合成致死になった。一方、pic1-T269 温度感受性株は、許容温度（２５oC）では、pot1 破壊と合成致死にならなかったが、半許容温度（３３oC）では、pot1 破壊と合成致死になった。pot1 pic1-T269 二重変異株の合成致死の機構を解明するために、２５oC で作成した pot1 pic1-T269 二重変異株を半許容温度（３３oC）にあげた時の表現型を解析した結果、DNA ダメージフォーサイと染色体分配異常の頻度が上昇することがわかった。pot1 pic1-T269 二重変異株は２５oC では環状染色体を持っていることから、Pic1 は環状染色体の維持に必要であることがわかった。本発表ではこれらの結果について紹介したい。

cancer, chromosome, fission yeast

発表責任者：上野　勝（scmueno@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A05p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A05 会場

Thermococcus kodakarensis の複製フォーク進行および修復を担う２つの Cdc45/RecJ

Two Cdc45/RecJ may work in replication fork progression and repair in *Thermococcus kodakarensis*

○永田 麻梨子[1]、石野 園子[1]、山上 健[1]、SIMONS Jan-Robert[2]、金井 保[2]、跡見 晴幸[2]、石野 良純[1] ([1]九大院農、[2]京大院工)

○Mariko NAGATA[1], Sonoko ISHINO[1], Takeshi YAMAGAMI[1], Jan-Robert SIMONS[2], Tamotsu KANAI[2], Haruyuki ATOMI[2], Yoshizumi ISHINO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyoto Univ.)

真核生物における Cdc45 は、DNA 複製ヘリカーゼである CMG (Cdc45-MCM-GINS)複合体の構成因子であり、真正細菌で DNA 修復および組換え機構に関与することが知られている RecJ と配列上の相同性を有する。原核生物でありながら、真核生物と共通の複製装置を有するアーキアに存在する Cdc45/RecJ ホモログがどのような機能を担うのかたいへん興味が持たれる。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* には 2 つの Cdc45/RecJ ホモログが存在しており、それぞれの相互作用因子から GAN (GINS-associated nuclease) と HAN (Hef-associated nuclease)と名付けられた。我々は GAN が GINS と MCM とで複製ヘリカーゼ GMG 複合体を形成するが、真核生物の CMG 複合体とは違った様式で機能することを示してきた (Nagata et al. 2017, *Nucleic Acids Research*)。また、もう一方の HAN の相互作用因子である Hef は、複製フォーク構造 DNA に対して働き、フォークの分岐点を移動させるヘリカーゼドメインと、分岐点にニックを入れるヌクレアーゼドメインから成るタンパク質として機能を有するタンパク質として *Pyrococcus furiosus* から同定されたものである (Komori et al. 2002, *Genes & Genetic Systems*)。

本研究において、詳細に HAN のヌクレアーゼ活性を調べると、一本鎖 DNA および RNA を 3′ から 5′ 方向へ切断するエキソヌクレアーゼであることが判明した。さらに *in vitro* において、複製フォーク構造の DNA を巻き戻して、3′ 一本鎖 DNA 領域を生じた際に、それに対する HAN のヌクレアーゼ活性は Hef により促進される一方で、そのフォーク構造 DNA に対する Hef のヌクレアーゼ活性は HAN により抑制されることがわかった。したがって、HAN と Hef の複製フォーク構造 DNA への機能は相互に制御されていると考えられる。また、Hef、HAN それぞれの遺伝子欠失株 (Δ*hef* と Δ*han*) を単離し、それらの表現型を調べると、Δ*hef* 株が UV、MMC、高温に対する高感受性を示したのに対し、Δ*han* 株のそれらに対する感受性は弱かったものの、親株に比べて優位な差が観察された。さらに、GAN と HAN の二重欠失株(Δ*gan*Δ*han*)を単離すると、Δ*gan*Δ*han* 株は至適生育温度でも生育しにくくなり、高温感受性である Δ*gan* 株よりもさらに強い温度感受性を示した。遺伝子欠失株のこのような表現型は、GAN を含まない不完全なヘリカーゼ複合体による複製フォークの進行障害に加えて、進行停止の修復過程において Hef の補助機能を担う HAN の働きが欠失することで、高温での複製フォーク進行停止による生育障害がより顕著になることに起因するのではないかと予想される (Nagata et al. 2017, *Scientific Reports*)。

DNA replication, replication fork, DNA repair

講演番号：2A05p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A05 会場

Thermococcus kodakarensis のファミリーD DNA ポリメラーゼはヘリカーゼおよびプライマーゼと結合して効率的な複製装置を形成する
Family D DNA polymerase interacts with both helicase and primase to form an efficient replication machinery in *Thermococcus kodakarensis*
○沖 啓輔、永田 麻梨子、高島 夏希、山上 健、石野 園子、石野 良純（九大院農）
○Keisuke OKI, Mariko NAGATA, Natsuki TAKASHIMA, Takeshi YAMAGAMI, Sonoko ISHINO, Yoshizumi ISHINO (Kyushu Univ.)

DNA 複製は、ヘリカーゼによる二本鎖 DNA の解離、プライマーゼによるプライマー合成、およびポリメラーゼによるプライマー伸長の順に連続的に進行する。ラギング鎖の合成においてはプライマー合成と伸長が何度も繰り返されることから、リーディング鎖合成とラギング鎖合成が歩調を合わせて複製フォークを進行させるために、ヘリカーゼ、プライマーゼ、ポリメラーゼが協調して効率よく働く必要がある。ユリアーキオタに属する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* においては、MCM-GINS-GAN ヘリカーゼ複合体、PriS-PriL プライマーゼ、ファミリーB および D DNA ポリメラーゼ (PolB、PolD)がそれぞれの機能を果たしていると考えられている。我々はラギング鎖合成を担うと予想されるアーキア特有の PolD に、プライマーゼ、ヘリカーゼとの協調作用があるのではないかと考え、これらのタンパク質間での相互作用を酵母ツーハイブリッド法、Native PAGE、ゲル濾過クロマトグラフィー、SPR 法により解析した。その結果、PolD と Primase が安定な複合体を形成することを発見した。さらに両者が複合体を形成しうる条件で、DNA ポリメラーゼ活性とプライマーセ活性が、ともに機能的に働きうることも実験的に証明した。また、ヘリカーゼとプライマーゼの間には直接の相互採用がないが、PolD がヘリカーゼ複合体の構成因子である GINS と結合することによって、ヘリカーゼとプライマーゼのブリッジとなることを示した。これらの結果は、三者が複合体を形成することにより、ヘリカーゼによる二本鎖 DNA の開裂と協調して、プライマーゼによる RNA プライマー合成と PolD によるプライマー伸長反応を進めるという、効率のよい新生鎖合成機能を備えた複製装置が形成されたことを示している。我々は、この複製複合体の部分再構成を基に、*T. kodakarensis* のレプリソーム全体の再構成を目指している。

Archaea, DNA replication, Replisome

講演番号：2A05p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A05 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における挿入配列の転位誘導
Inductive transpositions of insertion sequences in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○竹谷 達成[1]、田靡 実咲[2]、大城 隆[2]、鈴木 宏和[2]([1]鳥取大院・持社創科、[2]鳥取大院・工)
○Tatsunari TAKETANI[1], Misaki TANABIKI[2], Takashi OHSHIRO[2], Hirokazu SUZUKI[2] ([1]Dept. Eng. ,Grad. Sch. Sust. Sci. ,Tottori Univ., [2]Dept. Chem. Biotechnol. ,Grad. Sch. Eng. ,Tottori Univ.)

【目的】我々は，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 細胞内の自発的変異を利用した酵素遺伝子変異法を研究している。その一環として，T7 RNA polymerase の耐熱化を試みたところ，偶然にも好熱菌内で機能する転位因子を見出した。転位因子は，遺伝子破壊や遺伝子挿入などの遺伝学的ツールとして利用できるが，好熱菌内で実際に機能する転位因子はほとんど報告されていない。本会では，これら転位因子の転位特性について報告する。
【実験】転位因子の転位は，*G. kaustophilus* MK536 を用いて分析した。MK536 株は，本来の *pyrF* 遺伝子を欠失しており，その一方で非機能的プロモーターと連結した *pyrF* 遺伝子全長を染色体上にもつ。このことから MK536 株は，基本的にウラシル要求性であるが，転位因子が *pyrF* 遺伝子全長の上流に挿入されると，極性効果により *pyrF* 遺伝子が発現するため，ウラシル原栄養性となる。そこでウラシルを含まない最少培地中で形成されるコロニー数を計測し，そこに塗布した全細胞数で割ることで，転位頻度を算出した。生育してきたウラシル原栄養性株の *pyrF* 上流をシークエンスし，そこに転位してきた転位因子ならびに挿入位置を解析した。転位因子の転位が自発的なのか誘導的なのかを調べるために，彷徨変異試験を行った。転位は，サザンブロット解析によっても分析した。
【結果と考察】MK536 株を，ウラシルを含まない最少培地で培養したところ，培養 3 日目から 4 日目にかけて原栄養性株が急激に増加した。7 日後の転位頻度は約 10^{-4} であった。転位は 60℃から 65℃培養において最も活発で，この温度は *G. kaustophilus* の生育至適温度と一致した。*G. kaustophilus* 染色体は，100 ほどの転位因子を含むが，*pyrF* 上流に転位したものは大きく 3 種(IS0302/IS0390 系，IS0015 系，および IS0169 系)に分類された。最も多く転位していた IS0302/IS0390 をサザンブロット解析したところ，本転位因子は Copy & Paste 型転位機構で無作為に染色体上に転位することが示された。ウラシル原栄養性株は 3 日目以降から出現したことから，転位はウラシル欠乏ストレスに応じて誘導されたと考察した。彷徨変異試験も，当該転位が誘導的であることを支持した。転位因子は，ゲノム構造や遺伝子発現を変化させることから，ウラシル飢餓にある *G. kaustophilus* は転位誘発によって環境適応確率を高めているのかもしれない。炭素源飢餓や窒素源飢餓による転位誘発を調べるために，炭素源や窒素源を欠いた寒天培地を調整し，その上で 3 日間培養後，細胞を回収した。サザンブロット解析により IS0302/IS0390 転位を調べたが，転位は見られなかった。

Geobacillus kaustophilus, insertion sequence, stress induction

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A05p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A05 会場

好熱菌転位因子 *IS0169* の細胞内転位特性の解析
Transposition properties of a thermophilic transposable element, *IS0169*
○鈴木 宏和[1]、清水 万由[2]、出口 朋也[2]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]鳥取大・工)
○Hirokazu SUZUKI[1], Mayu SHIMIZU[2], Tomoya DEGUCHI[2], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]Dept. Biotechnol. Eng., Tottori Univ.)

【目的】我々は，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 細胞内の自発的変異を利用した酵素遺伝子変異法を研究している。その一環として，T7 RNA ポリメラーゼの耐熱化を試みたところ，偶然にも好熱菌細胞内で機能する複数種の転位因子を見出した。転位因子は，逆向き反復配列で挟まれた DNA 領域で，トランスポザーゼ遺伝子を含む。トランスポザーゼが発現すると逆向き反復配列間を抽出し，他 DNA 領域に再挿入する。この性質により，転位因子は遺伝子破壊や遺伝子挿入などの遺伝学的ツールとして利用できるが，好熱菌内で機能する転位因子は，これまでにほとんど報告がなかった。本研究では，ここで見出された機能的転位因子の 1 つ（*IS0169*）に着目し，その細胞内転位能を解析した。
【実験】*G. kaustophilus* MK244 は，HTA426 株から派生した *pyrF* 欠失株で，ウラシル要求性である。*pyrF* を分断するように *IS0169* を挿入して転位検出カセット（*pyrF*::*IS0169*）を構築し，これを MK244 染色体に挿入することで MK672 株を得た。この株はウラシル要求性であるが，検出カセットから *IS0169* が転位した場合，*pyrF* 遺伝子が復帰するためウラシル原栄養性となる。そこで MK672 株をウラシル欠失最少培地に塗布し，そこで生育してくるコロニー数をカウントすることで，*G. kaustophilus* 中における *IS0169* 転位を分析した。
【結果と考察】ＬＢ培地中で前培養した MK672 株をウラシル欠失最少培地に塗布し，60°C で培養したところ，培養 3 日目から 4 日目にかけてコロニーが急激に増加した。それらウラシル原栄養性株の染色体上では，検出カセットから *IS0169* が転位していた。前培養中に *IS0169* が転位していた場合，プレート培養 1 日目からコロニーが形成されることから，*IS0169* は主にプレートに塗布された後に，おそらくはウラシル飢餓ストレスによって転位誘発されたと考えられる。彷徨変異試験も，*IS0169* が誘導的に転位することを示唆した。長時間培養した混合細胞から染色体を抽出し，*IS0169* 転位後の塩基配列をダイレクトシークエンスで調べたところ，完全な *pyrF* 遺伝子配列のシグナルが得られた。よって *IS0169* 転位は，余計な塩基を欠失もしくは残存させることなく起こると考えられる。*IS0169* 転位は，65°C において最も高頻度であった。これは *G. kaustophilus* の生育至適温度（60~65°C）に一致する。大腸菌に pGKE96-*IS0169* を導入したところ，トランスポザーゼを高発現させても *IS0169* 転位は見られなかった。さらに *IS0169* ホモログは，一部の *Geobacillus* 属細菌に分布していた。以上の結果は，*IS0169* が *Geobacillus* 属細菌に特化した転位因子であることを示唆している。現在，IS0169 トランスポザーゼを利用した好熱菌用の遺伝子ランダム転位ツールを開発している。

Transposable element, Thermophile, *Geobacillus*

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A05p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A05 会場

核様体タンパク質の一種 NdpA ホモログの相同組換え頻度に及ぼす影響の解析

Role of NdpA homologs, one of the nucleoid-associated proteins of bacterial cells, in homologous recombination in pseudomonads

○佐道 陽弘、角埜 裕基、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Akihiro SADOH, Yuki KADONO, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】核様体タンパク質（nucleoid-associated proteins; NAPs）は、真核生物におけるヒストンのように細菌中で染色体の構造変化に関与するタンパク質であり、DNA を曲げるもの、巻くもの、架橋するものなどが存在し、その構造変化の結果できあがったゲノムのトポロジーに基づいてゲノム上の遺伝子の転写制御が起こるとされている。すなわち、トポロジーの形成を介して NAPs は遺伝子発現を制御していると言える。我々の研究グループでは IncP-7 群プラスミド pCAR1 を保持する *Pseudomonas putida* KT2440 株［KT2440(pCAR1)］に存在する H-NS ファミリータンパク質 TurA, TurB, Pmr の 3 つの NAPs に焦点を当てた研究がなされてきた。一方で、KT2440(pCAR1)には他にも多種多様な NAPs が存在している。その中の一種である NdpA ホモログに関しては世界的に見ても研究が不足しており、大腸菌において核様体に NdpA ホモログである YejK が存在すること［Murphy et al., 1999, *JB*, 181:3842-44］、YejK は単量体、二量体、四量体を形成し DNA gyrase やトポイソメラーゼ IV と相互作用すること、*yejk* 遺伝子破壊株は野生株と比べて生育遅延は見られないが DNA 合成が遅延すること［Lee et al., 2013, *JBC*, 288:31503-16］が報告されているのみである。本研究では、大腸菌以外の属の細菌やそのプラスミドに由来する NdpA ホモログの機能解析を行うため、KT2440(pCAR1)をモデルに宿主染色体とプラスミド上にコードされる 2 種の NdpA ホモログ（それぞれ NdpA, Pnd）を対象にして基本性質の解明を行い、その差違について評価することを目的とした。

【方法・結果】以前の研究で、NdpA ホモログの単独破壊株 KT2440Δ*ndpA*、KT2440Δ*ndpA*(pCAR1)、KT2440(pCAR1Δ*pnd*)及び二重破壊株 KT2440Δ*ndpA*(pCAR1Δ*pnd*)が作製されていた。本研究で、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 を保持する単独破壊株及び二重破壊株についてカルバゾール資化能を確認したところ単独破壊株では確認できたのに対し二重破壊株では全く確認できなかった。そこで、二重破壊株に対して pCAR1 の構造変化を確認したところカルバゾール分解遺伝子群が欠失していることが明らかになった。これまでに、pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群が相同組換えによって欠落し、構造変化が生じることが報告されており［Takahashi et al., 2009, *AEM*, 75:3920-29］、今回の現象も相同組換えによる欠失の結果生じた現象であった。以上のことから、NdpA ホモログが細胞内に存在しないと相同組換え頻度が上昇し pCAR1 上の分解遺伝子の欠失が頻発したと予想された。そこで、染色体上の NdpA 遺伝子単独破壊株 KT2440Δ*ndpA* も含めて、相同組換え頻度を定量的に測定するため、現在は相同組換え頻度測定系を構築している。

nucleoid-associated proteins, homologous recombination, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A05 会場

新規宿主・ベクター系の構築を目指した自己伝達性プラスミドの取得と機能解析
Functional analyses of self-transmissible plasmids captured from natural environments to construct a novel host-vector system
○前島 由明[1]、仲田 裕貴[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、井上 謙吾[3]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1]([1]静大院・総合科技、[2]静大グリーン研、[3]宮崎大・農)
○Yoshiaki MAEJIMA[1], Hiroki NAKATA[1], Ryota MORIUCHI[2], Hideo DOHRA[2], Kengo INOUE[3], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST, [3]Miyazaki Univ.)

【目的】
プラスミドは，細菌の染色体とは物理的に別に存在する自律複製遺伝因子であり，細菌間を伝播することで，薬剤耐性などの新たな形質を，そのプラスミドをもつ細菌（宿主）にもたらす．そのため，細菌の外部より目的 DNA 断片を移入するのに用いられてきた．このとき，宿主に目的 DNA を移入するためのプラスミドをベクターとよび，宿主とベクターの組み合わせを宿主・ベクター系とよぶ．宿主・ベクター系は，ある細菌について遺伝子レベルの研究を行うための必須ツールである．しかし，環境中から次々に新たな細菌やプラスミドが見出されるのに比べ，確立した宿主・ベクター系の数は乏しく，研究対象とする微生物ごとに，個別に確立する必要があるため，研究を遂行する上での妨げとなっている．本研究では，環境中から新たに自己伝達性のプラスミドを取得し，その複製・維持・伝達能を担う遺伝子を明らかにすると共に，複製・伝播可能な宿主の種類を明らかにし，新たな系の構築を含め，宿主・ベクター系の充実を図ることを目的とした．
【方法・結果】
三親接合によるプラスミドキャプチャリングは，自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドを伝達させる能力を指標に，環境中より自己伝達性プラスミドを取得する手法である．我々は，本手法を用いて，環境サンプル（土壌，グラニュール，牛糞）から自己伝達性プラスミドの収集を試みた．可動性プラスミドとそれをもつ菌株には *Escherichia coli* DH5α (pBBR1MCS-2)（カナマイシン耐性）を，受容菌には染色体上に GFP 遺伝子を挿入した *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4GFP（ゲンタマイシン・リファンピシン耐性）または *P. stutzeri* JCM 5965GFP（ゲンタマイシン・リファンピシン耐性）を用いた．3 種の抗生物質耐性と蛍光を示した接合完了体候補株を単離し，全 DNA を抽出後，プラスミドの不和合性群（IncP-1，IncP-3，IncW，PromA）を識別するプライマーセットを用いて PCR を行った．
その結果，プラスミドをもつと推定され，単離に成功した 401 株のうち，18 株については，IncP-1 群近縁のプラスミドを，99 株については PromA 群近縁のプラスミドを保持すると推定された．また，8 株のプラスミドについては全塩基配列を決定した．塩基配列に基づく系統分類学的な解析の結果，PromA 群近縁の pSN1104-11 と pSN1104-34 および不和合性群未知の pSN1216-29 の 3 つは新規性の高いプラスミドであることが示唆された．
さらに pSN1216-29 については，複製に必須な遺伝子領域を決定するために，複製開始タンパク質をコードすると推定される遺伝子（*repA*）と，複製開始点（*oriV*）を含むと推定される領域およびテトラサイクリン遺伝子を連結したミニレプリコンを作製し，*E. coli* JM109 内で複製されるかどうか調べた．その結果，1686 bp の推定 *repA*，*oriV* の領域を含むミニプラスミド p29ori001 については複製が認められた．現在，PromA 群近縁のプラスミドについても同様の実験を行うと共に，詳細な *oriV* 領域の決定を試みている．

self-transmissible plasmid, plasmid capturing, replication

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A05p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A05 会場

好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析

Comparisons of transferability and host range of conjugative plasmids under aerobic, microaerobic, and anaerobic conditions

○柳谷 洸輔[1]、越智 健太郎[2]、仲田 裕貴[1]、井上 謙吾[3]、水口 千穂[4]、野尻 秀昭[4]、大熊 盛也[5]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1]([1]静大院・総合科技、[2]静大工、[3]宮崎大・農、[4]東大・生物工学セ、[5]理研・BRC-JCM)

○Kosuke Yanagiya[1], Kentaro Ochi[2], Hiroki Nakata[1], Kengo Inoue[3], Chiho Minakuchi[4], Hideaki Nojiri[4], Moriya Ohkuma[5], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Miyazaki Univ., [4]BRC, Tokyo Univ., [5]RIKEN BRC-JCM)

【目的】遺伝子組み換えツールとして用いられるプラスミドは，好気条件下の接合伝達性や宿主域については詳細に研究が進められてきたが，土壌中や動物体内等の実環境中で想定される微好気・嫌気的条件下についてはほとんど研究されていない．本研究では，酸素濃度の違いによって，プラスミドの接合伝達性や宿主域が変化するかを検証することを目的として行った．

【方法・結果】供与菌には絶対好気性菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株の派生株である SMDBS 株，または通性嫌気性菌 *P. stutzeri* JCM 5965^T を用い，プラスミドには 不和合性群 IncP-1 群に属する pBP136::*gfp* と IncP-7 群に属する pCAR1::*gfp* を用いた．また，受容菌には通性嫌気性を示す細菌に抗生物質耐性能を付与した *Buttiauxella agrestis* JCM 1090R 株，*Pantoea agglomerans* JCM 1236R 株，*Pseudomonas stutzeri* JCM 5965RG 株を用いた．好気・微好気・嫌気条件下における接合実験は以下の手法で行った．好気条件で培養した供与菌（*P. putida* または *P. stutzeri*）と 3 種の受容菌を嫌気チャンバー内（酸素濃度 100 ppm 以下）で混合して，フィルター上で 24 時間接合させた場合を微好気条件下の接合実験，嫌気条件で培養した供与菌（*P. stutzeri* のみ）と 3 種の受容菌を，同様に嫌気チャンバー内で接合させた場合を嫌気条件下の接合実験とした．いずれの条件の接合実験についても，各混合液を嫌気チャンバー内で選択培地に塗布・静置し，コロニーが出現した後，それらを酸素に暴露した際に，GFP に由来する蛍光を示すかどうかを指標にして接合完了体を検出した．得られた接合完了体数を供与菌数と受容菌数の積で割ったものを伝達頻度として算出し，各条件下で得られた値について比較した．その結果，*P. putida* を供与菌とした場合，pBP136 はいずれの受容菌に対しても，また pCAR1 は *P. stutzeri* に対して，好気・微好気の各条件で接合伝達が認められた．また *P. stutzeri* を pBP136 の供与菌とした場合，*P. stutzeri* に対する接合伝達が好気・微好気・嫌気の各条件で認められた．以上から接合伝達自体には酸素が必須でないことが示唆された．また，その接合伝達頻度は，いずれのプラスミドについても，またどの供与菌・受容菌の組み合わせについても，好気条件より微好気・嫌気条件の方が 10^1~10^2 低下した．

また，*P. putida* SMDBS を pBP136 の供与菌とし，牛糞やメタン発酵槽内のグラニュール中の微生物群集を受容菌候補として好気・微好気条件下で接合実験を行い，接合完了体の蛍光を指標にしたフローサイトメトリーとセルソーターによって，固体栄養培地上にソーティングした．形成したコロニーについてプラスミドの有無を確認後，16S rRNA 遺伝子を増幅して配列を解読し，EzTaxon によって属レベルの同定を行った．その結果，接合伝達頻度は，前述の接合実験と同様に，好気条件下よりも微好気条件下の方が約 10^1~10^2 低かった．また微好気条件下の実験からは，好気条件下では得られなかった *Citrobacter* 属と *Klebsiella* 属の接合完了体を得られた．従って，酸素濃度の低い条件下では，接合伝達頻度は低下するが，これまでに知られていないプラスミドの宿主が得られることが示唆された．現在，新たに取得した新規プラスミド pSN1104-11，pSN1216-29 についても，同様の実験を試みている．

host range, microaerobic/anaerobic conditions, gene transfer

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A05p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A05 会場

変異 *pheS* 遺伝子を用いたメタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* (Bath) の効率的遺伝子破壊
An efficient gene disruption with the mutated *pheS* as a counter selective marker in *Methylococcus capsulatus*(Bath)

○横江 奨[1]、石川 聖人[1]、加藤 創一郎[2]、堀 克敏[1] ([1]名大院工、[2]産業技術研究所)
○Sho YOKOE[1], Masahito ISHIKAWA[1], Souichiro KATO[2], Katsutoshi HORI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]AIST)

【目的】大気中のメタンの温室効果は CO_2 の 25 倍にも及ぶため、地球温暖化の抑制に向け、大気中のメタンを削減することは重要である。メタン酸化細菌は常温・常圧下でメタンをメタノールに変換する特殊な酵素を有していることから、不要な大気中メタンを分解するのみならず、これを有用な物質に変換する微生物宿主として注目されている。このような期待を寄せられていながらも、メタン酸化細菌を用いたメタンの有用物質変換は未だ実用されていない。この原因の一つとして、メタン酸化細菌用の遺伝子工学ツールが整備されていないことが挙げられる。代表的なメタン酸化細菌である *Methylococcus capsulatus* (Bath)においては、*sacB* 遺伝子を対立遺伝子マーカーとした遺伝子破壊株の取得例がわずかに報告されているのみである。我々は、先行論文を参考に遺伝子破壊を試みたが、再現することはできなかった。そこで本研究では、Bath 株の効率的な遺伝子破壊を実現するために、*sacB* 遺伝子に替わる対立遺伝子マーカーの検討を行った。
【方法】Bath 株はフラスコのヘッドスペースにメタンと空気が 1:4 となるように密栓し、NMS 培地にて 42℃で振とう培養を行った。*sacB* 遺伝子を含む自殺ベクターpJQ200SK に標的遺伝子の上流・下流の相同配列をクローニングし、大腸菌との接合伝達によって、これを Bath 細胞へ導入した。また、*sacB* 遺伝子の代替マーカーとして、Bath 株由来の *pheS*（フェニルアラニン tRNA 合成酵素の α サブユニットタンパク質のコード遺伝子）に点変異を加えたものを利用した。対立遺伝子マーカーの効果は寒天培地での生育状態によって評価し、標的遺伝子の欠損については PCR にて確認した。
【結果と考察】一般に、*sacB* 遺伝子の導入されたグラム陰性菌はスクロースを含む培地で致死となるため、対立遺伝子マーカーとして汎用されている。しかし、我々は、グラム陰性菌であっても Bath 株では *sacB* 遺伝子が機能せず、スクロースを含む培地上でも生育することを見出した。一方、*sacB* 遺伝子の代替マーカーとして構築した変異 *pheS* 遺伝子を有する Bath 株は 10mM 以上の *p*-クロロフェニルアラニン(*p*-Cl Phe)を含む培地上で致死となった。この結果に基づき、変異 *pheS* 遺伝子を対立遺伝子マーカーとして利用し、ある遺伝子の破壊を試みたところ、標的遺伝子の欠損株を効率的に取得することができた。本研究の成果は、効率的なメタン・有用物質変換プロセスの構築に向けたメタン酸化細菌の代謝工学に大いに貢献するであろう。

Methylococcus capsulatus (Bath), counter selective marker, methane

発表責任者：堀克敏（khori@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A05p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A05 会場

枯草菌ゲノム移動を可能にする接合伝達系の構築

A conjugal transfer system able to transmit the *Bacillus subtilis* genome

○板谷 光泰、長谷川 美紀、佐藤 満（慶應大学先端生命研）
○Mitsuhiro Itaya, Miki Hasegawa, Mitsuru Sato (Inst. Adv. Biosci.)

枯草菌ゲノム中で多数の DNA を連結する画期的な手法を開発し巨大なゲノム DNA を合成する技術を示している。DNA 連結のためには枯草菌独自のナチュラルコンピテンスを利用して DNA を細胞内に導入できる形質転換法が有効であるが、構築したゲノム DNA サイズが 200kbp を超えると形質転換効率が下がる。さらに、これだけのサイズの DNA は溶液中に取り出すと擦り切れてしまい別の枯草菌に効率よく丸ごと移すのは困難になる。

そこで形質転換に依存しない DNA 導入法として、接合伝達の利用を考えた。接合伝達はナチュラルコンピテンスとは全く異なる原理で進行し、巨大 DNA を無傷で取り扱う手法として期待され、我々は、接合伝達プラスミド pLS20 の利用を 15 年前から進めている。pLS20 は、1977 年に田中（暉夫）らによって納豆菌から分離され、我々も含めた複数のグループの研究により T4SS（TypeIV Secretion System）系で作動することが解明されている。

枯草菌ゲノムを接合伝達で移動させる取り組みの一環として、モバイルプラスミドである pUB110 の oriT110 配列を枯草菌ゲノム中に組み込んだ。この oriT110 保持株は、pLS20 がヘルパープラスミドとして存在する場合のみ、組み込まれた oriT110 の上流、下流のゲノムマーカーが oriT の方向に対応してレシピエントの枯草菌に移動した。大腸菌で知られている、Hfr（high frequency recombination）に相当するシステムが枯草菌で作動すると、枯草菌ゲノムベクターでの大規模なゲノム構築の画期的な手法になると期待できる。

Genome vector, conjugatinal plasmid, origin of transfer

発表責任者：板谷光泰（mita2001@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：2A05p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A05 会場

IncP-9 群プラスミド NAH7 の新規な接合伝達必須遺伝子の機能解明
Functional analysis of novel conjugative transfer gene in IncP-9 plasmid
○岸田 康平、Tim Lucas、野々山 翔太、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大学院生命）
○Kohei Kishida, Lucas Tim, Shouta Nonoyama, Yuji Nagata, Yoshiyuki Ohtsubo, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達による遺伝子の水平伝播は生物の多様な環境への適応進化に大きく寄与している。接合伝達装置は共通した 2 つのシステムにより成り立つと理解されており、Dtr (DNA transfer and replication)システムは供与菌内で接合伝達開始領域から一本鎖 DNA (ssDNA)を生成し、Mpf (mating-pair formation)システムは供与菌と受容菌細胞同士を連結する接合対を合成する。各種の接合伝達性プラスミドでこれらシステムに関連する遺伝子が保存されている。一方、我々は IncP-9 群に属するナフタレン分解プラスミド NAH7 の研究で、既存の接合伝達モデルに含まれていない接合伝達必須遺伝子 *orf34* を同定した。*orf34* は多くのプラスミド上に存在していたが、機能は不明であった。*orf34* の機能解明は未解明点の多い接合伝達システムの解明に繋がる。そこで本研究では新規接合伝達必須遺伝子 *orf34* の機能解明を目的とした研究を行った。
【結果・考察】Orf34 が供与菌と受容菌のどちらで機能するかを明らかとするため、供与菌と受容菌のいずれかに pUC18::orf34 を保持させ、*orf34* を破壊した NAH7 誘導体(以下、NAH7 Δ 34)の接合伝達試験を行ったところ、供与菌に pUC18::orf34 を保持させた株のみが NAH7 Δ 34 の接合伝達能が回復した。次に、Orf34 の供与菌細胞内での局在を解析するため、FLAG タグを付与した *orf34* を発現するプラスミドを作製した。この Orf34-FLAG は Orf34 と同等の機能を有していることを接合伝達試験で示した。次に、Orf34-FLAG を発現させた細胞を細胞膜、ペリプラズム、細胞質に分画後、FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、ペリプラズム画分でのみシグナルが検出された。これらのことから Orf34 は供与菌細胞のペリプラズムで機能していることが強く示唆された。
　相同性検索より Orf34 は特徴付けられていない TrbM ドメインの一部を有していると推測された。このドメインを有すタンパク質をコードする遺伝子は IncP-9 群の pWW0、IncW 群の R388、IncP-1 群の R751 の上にも存在した。これら *orf34* オルソログを NAH7 Δ 34 に相補したところ、NAH7 Δ 34 の接合伝達能は回復した。このことから *orf34* と同機能を有す遺伝子が多くのプラスミドで保存されていると示唆された。

horizontal gene transfer, conjugative transfer, plasmid

発表責任者：岸田康平（kishida@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A05p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A05 会場

プロファージの有無がプラスミド保持株の fitness に与える影響
Fitness of plasmid host is influenced by the presence of prophages
○LE THI THANH THU[1]、ファム ティー キム ユン[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大グリーン研)
○THI THANH THU LE[1], THI KIM DUNG PHAM[1], Ryota MORIUCHI[2], HIDEO DOHRA[2], KAZUHIDE KIMBARA[1], MASAKI SHINTANI[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【背景と目的】ある環境における細菌の生存のしやすさは fitness で示され，異なる菌株を等量ずつ混合した後，継代培養を繰り返し，各菌株がどの程度優占化するのか調べて評価する（競合試験）．我々は細菌がプラスミドをもつことで，その fitness にどのような影響が生じるのかを調べてきた．通常，プラスミドをもつ菌株（宿主）の fitness は，プラスミドをもたない菌株に比べて低下する．しかし我々は，*Pseudomonas putida* PpY101 株を，pBP136（IncP-1 群）または pCAR1（IncP-7 群）というプラスミドの宿主とした場合に，その fitness が上昇する現象を見出した．この現象は，PpY101 株と同一の菌株に由来する KT2440 株を宿主とした場合には認められなかった．双方の全ゲノム配列比較の結果から，本現象には KT2440 株上の 4 つのプロファージ（P1~P4）のうち，P1 が寄与する可能性が示された（以上昨年度本大会にて報告）．本研究は，本現象の原因を解明し，プラスミドと細菌がどのように共存してきたのかを理解することを目的とする．本発表では，双方の菌株について，pBP136 の有無による転写産物の発現量の違いを調べた結果と，その結果を受けて，KT2440 株上の複数のプロファージの有無によって，宿主の fitness にどのような変化が生じるのかを調べた結果について報告する．
【方法・結果・考察】KT2440 株と PpY101 株について pBP136 の有無による転写産物の発現量変化を RNA シークエンスによって比較したところ，KT2440 株における P1（PpY101 株の欠落箇所）や，他のプロファージ上の遺伝子群の発現量には違いがほとんど認められなかった．一方，P1 をもたない PpY101 株では，プラスミドの有無にかかわらず，プロファージ P4 上の遺伝子群の発現量が増大していた．この結果から，KT2440 株上のプロファージ領域の有無によって，宿主の fitness が変化しうることが示唆された．そこで，KT2440 株より P1 または P4，および P1 と P4 の双方を脱落させた ΔP1 株，ΔP4 株，ΔP1ΔP4 株と，全プロファージを脱落させた Δall-Φ 株を準備し，pBP136 をもつ場合ともたない場合の fitness 変化を競合試験によって調べた．その結果，ΔP1 株を宿主とした場合には fitness がほぼ変化しなかったが，ΔP4・ΔP1ΔP4 株を宿主とした場合には，その fitness が上昇した．以上の結果から，その原因や機構は不明であるが，プラスミドとプロファージという異なる外来遺伝因子が，宿主内で影響を及ぼしあってその fitness に変化をもたらす可能性が示された．現在，Δall-Φ 株を宿主とした場合の競合試験を行うとともに，各欠損株が pCAR1 をもつ場合についても同様に調べている．

plasmid, fitness host, prophage

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A05p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A05 会場

PCB/ビフェニル分解性シュードモナス細菌の安息香酸分解系トランスポゾン欠失株の諸性質
Characterization of deletion mutant of the benzoate catabolic transposon in PCB/biphenyl degrading *Pseudomonas*

○廣瀬 遵[1]、米村 凌[1]、末永 光[2]、木村 信忠[3]、渡邊 崇人[4]、宮武 宗利[1]、横井 春比古[1]、二神 泰基[5]、後藤 正利[6]、藤原 秀彦[7]、古川 謙介[7] ([1]宮崎大・工、[2]産総研・創薬基盤、[3]産総研・生物プロセス、[4]京大・生存研、[5]鹿大・農、[6]佐賀大・農、[7]別府大・食物栄養)
○Jun HIROSE[1], Ryo YONEMURA[1], Hikaru SUENAGA[2], Nobutada KIMURA[3], Takahito WATANABE[4], Munetoshi MIYATAKE[1], Haruhiko YOKOI[1], Taiki FUTAGAMI[5], Masatoshi GOTO[6], Hidehiko FUJIHARA[7], Kensuke FURUKAWA[7] ([1]Faculty Eng. Univ. Miyazaki, [2]Biotechnol. Res. Inst. Drug Discovery AIST, [3]Bioproduction Res. Inst. AIST, [4]RISH Kyoto Univ., [5]Faculty Agric. Kagoshima Univ., [6]Faculty Agric. Saga Univ., [7]Dept. Food Nutri. Beppu Univ.)

（目的）PCB/ビフェニル分解性細菌のビフェニル代謝経路をコードする *bph* オペロンの近傍に存在する *bza* 遺伝子群(全長 20.0 kb)は、ビフェニルの中間代謝産物である安息香酸のメタ開裂分解経路および安息香酸輸送体と推定されるタンパク質をコードしており、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 の他、種が異なる複数のシュードモナス属細菌のゲノム配列から見いだされている。また、*bza* 遺伝子群は *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 由来の IS*Azch1* と 85%の相同性を有する 2 つの IS に内包された全長 29.2kb の I 型の分解系トランスポゾン(Tn*Bza1*)の一部である（図 1)。本講演では安息香酸分解系トランスポゾン Tn*Bza1* の欠失株を取得して、*bza* 遺伝子群にコードされる安息香酸分解経路の役割について知見を得たので報告する。

（方法および結果）*P. pseudoalcaligenes* KF707 の野生株をビフェニルまたは安息香酸無しの非選択圧下で継代培養することにより *bza* 遺伝子群を自発的に欠失したΔ*bza* 株を取得することができた。Δ*bza* 株において、*bza* 遺伝子が欠失した位置に全長 1341bp の IS 領域が残存しており、1 コピーの IS と 26.6 kb の *bza* 遺伝子群をコードする領域が相同組み換えによって欠失していることが明らかとなった。Δ*bza* 株のビフェニルを唯一の炭素源として生育した場合の生育速度は、KF707 の野生株と比べて 20%低下した。また、Δ*bza* 株のビフェニルおよび安息香酸の代謝に伴う溶存酸素の消費速度は、野生株と比べて 40%低下した。一方、Δ*bza* 株は、ビフェニルおよび安息香酸の代謝能を維持しており、*bza* 遺伝子群の代わりに安息香酸オルト開裂分解経路をコードしている *ben* オペロンおよび *cat* オペロンが機能していることが示唆された。

以上の結果から、KF707 株のビフェニル代謝能は、中間代謝産物である安息香酸のメタ開裂分解経路をコードするトランスポゾン Tn*Bza1* の挿入によって増強されていることが裏付けられた。現在、プラスミドに連結した *bza* 遺伝子をΔ*bza* 株に導入した復帰株を作成することにより、*bza* 遺伝子群の導入によるビフェニル代謝能の増強およびビフェニル代謝経路の機能進化の再現を試みている。

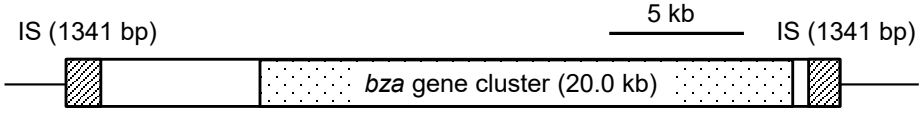


図 1　安息香酸分解系トランスポゾンTn*Bza1*（ 29.2 kb）

benzoic acid, *Pseudomonas*, transposon

発表責任者：廣瀬　遵（jhirose@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A05p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A05 会場

乳酸菌の遺伝子組換えに用いる CRISPR/Cas9 ベクターの構築
Development of CRISPR/Cas9 vectors for genetic modification in lactic acid bacteria
○知久 勤[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生科)
○Tsutomu CHIKU[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】
CRISPR-Cas9 は汎用性が高く簡便なゲノム編集ツールであることから真核生物において広く用いられている。一方、多くの原核生物では染色体の二本鎖切断が致死的となるため直接的な遺伝子改変への利用は困難であるが、補助的なツールとしての利用が試みられている。乳酸菌はこれまでの多くの研究によって遺伝子組換え技術が確立されており、一部の菌株においては比較的容易に変異株や組換え体を作製することが可能である。しかし、ダブルクロスオーバーによる遺伝子置換などにおいては、組換え体の出現頻度が極端に低いために目的とするクローンの取得が困難となる場合がある。この際、CRISPR/Cas9 を選択圧として利用することで目的としないクローンの排除が可能となり、スクリーニングの効率を大幅に向上させることができる。本研究においては、乳酸菌で利用可能な CRISPR/Cas9 をもったプラスミドベクターを構築し、組換え体の取得効率を向上させることを目指す。
【実験結果・考察】
Streptococcus pyogenes JCM 5674 由来の Cas9 を pTRK882 へ挿入し、大腸菌を用いてクローニングを行った。Cas9 タンパク質の産生が確認されたクローンからプラスミドを精製し、*Lactobacillus paracasei* IGM394 へ導入した。その結果、同乳酸菌株においても Cas9 の発現が確認された。続いて *L. paracasei* 由来のサーチュイン遺伝子(*sirA*)を標的とした sgRNA 配列を含む DNA 断片を pTRK669 へ挿入し、大腸菌を用いたクローニングを経てプラスミドを調製した。これらのプラスミドの両方あるいは片方のみで *L. paracasei* IGM394 の形質転換を行ったところ、片方のみで形質転換を行った場合にはコロニーの出現が認められたが、両方を導入した場合には形質転換体が得られなかった。また、*sirA* 欠損変異株を用いて同様の試験を行ったところ、両方のプラスミドが導入された形質転換体を得ることができた。以上の結果は、構築された CRISPR/Cas9 を含むプラスミドが機能することで標的配列を含む乳酸菌のクローンが選択的に排除されたことを示唆している。現在我々はいくつかの乳酸菌遺伝子組換えにおいて、実際にスクリーニング効率を向上させるかどうかについて検証を進めている。

CRISPR/Cas9, Lactic acid bacteria, screening

講演番号：2A05p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A05 会場

ヒト腸内常在菌叢最優勢種 *Bacteroides dorei* におけるマーカーレス遺伝子欠損系の確立およびポリアミン代謝系遺伝子の機能解析

Development of a markerless gene deletion system in *Bacteroides dorei* and functional analysis of the polyamine biosynthetic gene

○阪中 幹祥、杉山 友太、奈良 未沙希、北方 彩、栗原 新（石川県大生資環）
○Mikiyasu SAKANAKA, Yuta SUGIYAMA, Misaki NARA, Aya KITAKATA, Shin KURIHARA (Ishikawa Prefectural Univ.)

【背景・目的】

ヒトの腸内には数百種類の細菌からなる腸内細菌叢が形成されており、近年、宿主であるヒトの健康に様々な影響を及ぼすことが明らかになってきている。しかしその一方で、腸内細菌叢と宿主の共生に関する分子機構は不明な部分が多い。この分子機構を解明するには、腸内細菌の遺伝子機能解析が求められるが、それに必要な遺伝子欠損系は十分に開発されていない。今回我々は、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一種である *Bacteroides dorei* において、二重相同組換えによるマーカーレス遺伝子欠損系を確立すると共に、宿主の健康に関わる代謝物ポリアミンの生合成系遺伝子の機能を解析した。

【方法・結果】

一般に、二重相同組換えによるマーカーレス遺伝子欠損系で、2 回目の相同組換えが生じた株を効率良く選抜するためには対抗選択マーカーが必要となる。*Bacteroides* 属細菌においては、対抗選択マーカーとして、Δ*tdk* 株に 5-フルオロ-2′-デオキシウリジン（FUdR）感受性を付与するチミジンキナーゼ遺伝子 *tdk* が利用されている。そこでまず、*B. dorei* JCM 13471^{T} の Δ*tdk* 株を作出した。*tdk* の上流と下流に対応する DNA を *Bacteroides* 属細菌で複製できないプラスミドにクローニングし、*B. dorei* JCM 13471^{T} に導入した。その結果、13 株中 11 株において *tdk* 遺伝子座へのプラスミドの挿入が観察された。これらの 1 回目の相同組換え体（*tdk*$^{+}$、FUdR 感受性）から、2 回目の相同組換え体（*tdk*$^{-}$、FUdR 耐性）を FUdR 含有寒天培地にて選抜した結果、11 株中 7 株において *tdk* 欠損変異が導入されていた。Δ*tdk* 株は最少培地にて野生株と同じ生育能を示した一方で、FUdR に対する耐性能が付与されていた。

続いて、アルギニンからアグマチンへの変換反応を触媒するアルギニンデカルボキシラーゼの推定遺伝子 *speA*（ポリアミン生合成系遺伝子）を欠損した。*speA* の上流と下流に対応する DNA を *tdk* 連結プラスミドにクローニングし、Δ*tdk* 株に導入した。その結果、5 株中 1 株において *speA* 遺伝子座へのプラスミドの挿入が観察された。この 1 回目の相同組換え体（*tdk*$^{+}$、FUdR 感受性）から、2 回目の相同組換え体（*tdk*$^{-}$、FUdR 耐性）を FUdR 含有寒天培地にて選抜した結果、6 株中 3 株において *speA* 欠損変異が導入されていた。Δ*speA* 株は、親株と比較して最少培地での生育能が大幅に低下していたことに加えて、菌体内および培養上清中にポリアミンを蓄積しなくなっていた。以上の成果より、*speA* は *B. dorei* JCM 13471^{T} の生育およびポリアミン生合成に寄与していることが明らかとなり、さらに本研究で確立したマーカーレス遺伝子欠損系の有用性を実証することに成功した。

Markerless gene deletion, Gut bacteria, Polyamine

発表責任者：栗原 新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A05p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A05 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子が持つ IV 型線毛の機能解析
Functional analysis of type IV pili in the zoospore of *Actinoplanes missouriensis*
○木村 知宏[1]、手塚 武揚[1]、相沢 慎一[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]県立広島大・生命環境・生命科学)
○Tomohiro KIMURA[1], Takeaki TEZUKA[1], Shin-ichi AIZAWA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Life Sciences, Pref. Univ.of Hiroshima)

【背景・目的】　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、貧栄養環境下で多数の運動性胞子を内包した胞子嚢を形成する。胞子嚢は水浸すると開裂し、中から運動性胞子 (遊走子、zoospore) が放出される。遊走子はべん毛をもち、走化性に従って高速遊走し、栄養豊富な環境に辿り着くと発芽し、菌糸生長へ移行する。我々はこれまでに遊走軌道の解析や走化性の定量化を行ってきたが、光学顕微鏡観察時における遊走子のガラス表面への付着がしばしば問題になった。*A. missouriensis* ゲノム中には、菌体の基質表面への付着に寄与するⅣ型線毛 (type IV pili) を構成するに足る 8 遺伝子から成るオペロンが見出された。このオペロンは、胞子嚢形成期および遊走開始時に強く転写されていることが過去に行った RNA-Seq 解析の結果から示されたため、遊走子線毛の存在が示唆された。そこで、遊走子線毛を観察するとともに、線毛遺伝子破壊株を作製し、遊走子線毛の機能解析を試みた。

【結果・考察】　遊走子の透過型電子顕微鏡観察により、頻度は大変低いものの、べん毛より細く、かつカールしていない繊維状の構造体が観察でき、これを線毛の実体と判断した。線毛遺伝子クラスターの 4 番目に位置し、繊維タンパク質（ピリン）をコードする *pilA* は、そのすぐ上流にある独自の転写開始点からも強く転写されることが RNA-Seq 解析の転写プロファイルから示唆されていた。そこで、野生株胞子嚢から抽出した RNA を用いて S1 nuclease mapping を行い、*pliA* 独自の転写開始点を決定した。次に、*pilA* 破壊株を in-frame deletion により作製した。光学顕微鏡観察下では、*pilA* 破壊株は野生株よりもスムースに遊走した。さらに、遊走子液と栄養培地を 1 mL ずつ混合し、30℃で 1 時間置くことで遊走の停止と発芽を誘導したところ、野生株では 20～30 個の遊走子がブドウの房状になったものが顕微鏡観察されたのに対し、*pilA* 破壊株では 4 mm 程度の巨大な細胞塊が観察された。また、この際、野生株ではプラスチックチューブ表面に菌体が付着したが、*pilA* 破壊株ではほぼ付着しなかった。なお、ゲノム組込み型ベクターを用いて *pilA* を導入した遺伝子相補株では、野生株と同様の表現型を示した。以上の結果より、*A. missouriensis* の遊走子線毛の機能は、他の細菌のⅣ型線毛と同様、遊走停止時の基質表面への付着であると考えられる。非常に濃い濃度で遊走子を観察する実験条件下では、遊走の停止と発芽を誘導した際、遊走子の凝集が観察され、遊走子線毛はこの凝集を防ぐ働きを持っているように見えるが、遊走子の凝集が環境中の生理的条件で起こるかどうかは不明である。現在、遊走子の基質への付着能に関する線毛の機能をさらに解析している。

Actinoplanes missouriensis, type IV pili, zoospore

発表責任者：木村知宏（yiu35182@gmail.com）

講演番号：2A05p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A05 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢非開裂株の取得とその原因遺伝子の同定

Isolation of sporangium dehiscence-deficient mutants and identification of a gene (*AMIS_54230*) required for sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[2]、○光山 京太[1]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工)
Takeaki TEZUKA[2], ○Kyota MITSUYAMA[1], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Gad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では基底菌糸を伸張して増殖するが、栄養飢餓環境では多数の胞子を内包する胞子嚢を数多く形成して休眠する。胞子嚢は水分を感知すると覚醒し、開裂して外部環境中に胞子を放出する。放出された胞子はべん毛運動により水中を運動する遊走子となり、走化性により栄養豊富な環境に至ると運動を停止して発芽を開始する。*A. missouriensis* はこのように複雑な生活環を持つが、その詳細な制御機構に関してはほとんど解明されていない。本研究では、休眠細胞が外部環境の変化を感知して覚醒する分子機構の解明を目的として、*A. missouriensis* が形成する胞子嚢の開裂に関わる遺伝子の同定とその機能解析を行った。
【方法・結果】胞子嚢内部の胞子と胞子嚢から放出された胞子の耐熱性を比較した結果、50℃の湯浴中で 40 min 処理すると胞子嚢内部の胞子の生存率は処理前の約 1%となった一方、放出された胞子の生存率は約 0.0001%と大幅に低下していた。そこで、野生株を親株として UV 照射により作製した変異株ライブラリーから、胞子嚢内部の胞子が持つ耐熱性を利用したスクリーニングにより開裂能が劇的に低下した複数の変異株を取得した。変異株のゲノムリシーケンスにより変異点を決定したところ、ある変異株ではタンパク質の一次構造に影響を及ぼす変異は *AMIS_54230* の 229 番目のコドンがセリンからプロリンに変化する変異 (S229P) のみであった。この変異株に対してゲノム挿入型のプラスミドベクターで野生型の *AMIS_54230* を導入すると、胞子嚢の開裂能が野生株と同等まで回復したことから、*AMIS_54230* に生じた変異が開裂能低下の原因であると考えられた。そこで、野生株を親株としてゲノム上の *AMIS_54230* を欠失させた破壊株を作製したところ、正常な形状の胞子嚢が形成されるものの、その開裂能は野生株と比べて大幅に低下していた。この破壊株に野生型の *AMIS_54230* を導入すると、胞子嚢の開裂能が野生株と同等まで回復した。一方、S229P 変異型 *AMIS_54230* を導入しても胞子嚢の開裂能が全く回復しなかったことから、このセリン残基が AMIS_54230 の機能に必須であることが示された。AMIS_54230 は全長 243 残基で N 末端側に STAS ドメインを、C 末端側に ATPase ドメインを持つと予想される。STAS ドメインを持つタンパク質として anti-sigma factor antagonist、blue light sensor、anion transporter が知られている。S229P 変異は ATPase ドメイン中に生じていたため、野生型と S229P 変異型 AMIS_54230 を大腸菌で生産・精製して ATPase 活性を測定したところ、S229P 変異型タンパク質は野生型タンパク質よりやや低いものの ATPase 活性を有していた。今後、*AMIS_54230* 破壊が胞子嚢形成・開裂時の転写プロファイルに与える影響を調べる計画である。

Actinoplanes missouriensis, sporangium dehiscence, zoospore

発表責任者：大西康夫（ayasuo@ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A06 会場

A. oryzae 由来代謝制御転写因子 XlnR 制御遺伝子の網羅的解析とデータマイニング
Comprehensive identification of genes regulated by *Aspergillus oryzae* transcription factor, XlnR, and integrative datamining

○岡 大椰[1]、兒島 孝明[1]、井原 邦夫[2]、小林 哲夫[3]、中野 秀雄[1] ([1]名大院・生命農・生命技術、[2]名大・遺伝子実験施設、[3]名大院・生命農・生物機構)
○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Kunio Ihara[2], Tetsuo Kobayashi[3], Hideo Nakano[1] ([1]Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Centre for Gene Research, Nagoya Univ., [3]Dept. Biol. Mech. Funct., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】

DNA 結合型転写因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合し、遺伝子の発現を制御する。しかし、転写因子については多くのことが未だに未解明であり、転写因子のゲノム上の結合配列及び制御遺伝子を同定することは遺伝子発現システムを理解する上で非常に重要である。Genomic SELEX-Seq(gSELEX-Seq)は、転写因子に対して結合性を有する領域をゲノミックライブラリーから in vitro で濃縮選択した配列情報を高感度に出力できる手法である。本研究では、この gSELEX-Seq 法とマイクロアレイそれぞれより得られた情報を用いることで *in vivo, in vitro* 両面から麹菌由来のキシラン代謝制御転写因子 XlnR の結合部位をゲノムワイドで解析し、XlnR によるキシラン代謝制御機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

麹菌ゲノミックライブラリーを調製し、このライブラリーに対して XlnR を用いた gSELEX を 3 ラウンド実施した。高速 DNA シークエンサーによって各選択プールの配列を大量に取得し、得られた配列データの解析を行ったところ、XlnR の既知の結合モチーフである GGCT(A/G)A が抽出された。また、XlnR 結合活性を示すプロモーター配列を保有する遺伝子が多数検出された。この候補制御遺伝子リストとマイクロアレイによって同定された発現変動遺伝子（DEGs）75 種類と照合したところ、XlnR 結合が既知の遺伝子 7 種（xynF1, xynG1, xynG2, xylA, celA, celB, celC and celD）を含む 51 遺伝子において重複が確認された。プロモーター領域に結合部位を有し、かつ発現変動を受けるこれらの遺伝子は XlnR によって直接的に発現制御される遺伝子であると推定される。また、これらシークエンスデータに対するデータマイニングによって遺伝子上流内における既知の XlnR 結合モチーフの個数とマイクロアレイにおける遺伝子変動との間に相関がみられるということが新たな知見として得られた。さらに、同遺伝子内における XlnR 結合既知の配列と gSELEX-Seq によって新たに検出された異なる配列それぞれに対して BLI 法を用いた結合活性測定を行った結果、*in vitro* において gSELEX によって検出された配列がより高い結合親和性を持つことが判明し、gSELEX-Seq の精度の高さが改めて明らかとなった。

Aspergillus oryzae, gSELEX-Seq, transcriptome

発表責任者：兒島孝明（kojima@molbiotech-nagoya.org）

講演番号：2A06a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A06 会場

キメラ転写因子 $AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$ の構成的発現株によるアミラーゼ生産系の構築
Construction and characterization of a chimeric transcription factor $AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$ for amylase production by xylose

○山下 美春[1]、村田 俊輔[1]、辻上 誠也[1]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]、小林 哲夫[2] ([1]名城大農、[2]名大院生命農)
○Miharu YAMASHITA[1], Shunsuke MURATA[1], Masaya TSUJIKAMI[1], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

[背景・目的]
糸状菌は様々な酵素を生産することが知られ、食品から医薬品まで幅広く利用されている。これら酵素の生産は、それぞれに特異的な転写因子によって制御されている。AmyR はデンプン存在下でアミラーゼ群の発現を制御している。XlnR はキシラン存在下でキシラナーゼ群の発現を制御する転写因子である。これらの転写因子は、N-末端側に $Zn(II)_2Cys_6$ タイプの DNA 結合ドメインを有している。AmyR は $CGGN_8CGG$ を、XlnR はモノマーとして CGGNTAAW を、ダイマーとして TTAGSCTAA を認識して DNA と結合する。AmyR と XlnR の C-末端側ドメインはそのどちらも転写活性化に必要であること、XlnR の転写活性化にはキシロースが必要であることが明らかとなっている。
我々は既に、AmyR の N-末端側にある DNA 結合ドメインと XlnR の C-末端側に存在する転写活性化ドメインを融合したキメラ転写因子 ($AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$) がキシロース応答的にアミラーゼを誘導することを確認している。[1)] 本研究では、$AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$ を安定に高発現する株を作製することにより、稲わら等の未利用バイオマス誘導的なアミラーゼ発現系を構築することを目的とした。

[方法・結果]
A. nidulans 由来の AmyR の N-末端側 (1-68) と、*A. oryzae* 由来の XlnR の C-末端側 (159-971) を融合したキメラ転写因子 $AmyR^{N}$-$XlnR^{C}$ を *gapA* プロモーター支配下で高発現する株を構築した (以下、chimera 株と呼称)。グルコースを唯一炭素源とした最少培地 (MMG 培地) で 24 時間培養後、キシロースを唯一炭素源とした最少培地 (MMX 培地) へ菌体を移し、アミラーゼ活性を測定した。その結果、コントロール株と比べて chimera 株では 40 倍のアミラーゼ活性が検出されたことからキシロース誘導的にアミラーゼが生産されていることが示された。また、炭素源に稲わらを用いたところ、MMX 培地と同様に顕著なアミラーゼの誘導が確認された。稲わら等の未利用バイオマスを用いた有用酵素生産等、chimera 株の産業利用の可能性について考察する。

1) 田中ら、第 3 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集 p.42 (2003)

AmyR, XlnR, amylase

発表責任者：加藤　雅士（mkato@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2A06a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A06 会場

Aspergillus aculeatus における UDP-glucose 4-epimerase の欠損が糖質加水分解酵素生産に与える影響

The effect of the UDP-glucose 4-epimerase gene deletion on glycoside hydrolase production in *Aspergillus aculeatus*

○白柳 英俊、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (大阪府立大学)
○Hidetoshi SHIROYANAGI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーからセルロース資化能低下株を選抜し、各株における T-DNA 挿入領域を解析した結果、UDP-glucose 4-epimease 遺伝子（*uge5*）内に T-DNA が挿入された株を取得した。Uge5 はルロワール経路の代謝酵素であり、*uge5* 欠損株（Δ*uge5*）ではガラクトース資化能や細胞壁合成能が低下する事が知られているが、糖質加水分解酵素生産への影響は未解析である。そこで本研究では、*uge5* 欠損株（Δ*uge5*）、相補株（*uge5*$^{+}$）を作出し、糖質加水分解酵素生産および各種酵素遺伝子発現に与える *uge5* 破壊の影響を解析した。
【方法と結果】Δ*uge5* では、アビセル、ガラクトース、Locust Bean Gum (LBG) の資化能が低下していたことから、LBG およびセルロース性基質として Wheat Bran (WB) を単一炭素源とした場合のガラクトマンナン分解酵素およびセルラーゼ生産量を定量した。コントロール株、*uge5*$^{+}$ と比較して、Δ*uge5* では、LBG を炭素源とした場合の各酵素活性は著しく減少したが、WB に応答した酵素生産は培養後期で増加していた。次に、1% アビセル, 1% LBG, 1% WB で 9 時間誘導をかけた時の各酵素遺伝子発現量を定量した。コントロール株、*uge5*$^{+}$ と比較して Δ*uge5* では、転写因子 ManR 制御下のセルラーゼ遺伝子 *cbhI*, *cmc2*, *cel7b* のアビセル, WB, LBG に応答した発現は減少していた。一方で、同じく ManR 制御下にあるものの *manG*, *mndD*, *bgl5* の各種炭素源に応答した遺伝子発現には、uge5 欠損の影響がなかった。この *uge5* 破壊が酵素生産と ManR 制御下の遺伝子発現に与える多様な影響は、ManR と他の転写因子間で起きる協調と競合を介した制御によるものと推測した。そこで、ガラクトース資化に関与している転写因子 AraR および GalX の各転写因子欠損株(Δ*araR*, Δ*galX*) を作出し、上記遺伝子の発現誘導に与える影響を解析した。Δ*araR*, Δ*galX* における LBG に応答した各種遺伝子発現量は、コントロール株と同等であったことから、LBG に応答した遺伝子発現誘導において AraR あるいは GalX は ManR と協調的に作用していないことが判明した。LBG に応答した ManR を介した遺伝子発現の誘導物質は、ガラクトースでもマンノースでも無くマンノビオースであったことから、今後、マンノビオースを誘導物質として遺伝子発現解析を行うことで、LBG に応答した遺伝子発現誘導において観察された ManR の異なる作用の分子機構を紐解く計画である。

Aspergillus aculeatus, UDP-glucose 4-epimerase, ManR

講演番号：2A06a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A06 会場

Aspergillus nidulans における G タンパク質 α サブユニットを介したセルラーゼ生産抑制
Repression of cellulase production via G-protein α subunits in *Aspergillus nidulans*
○國武 絵美[1]、李 怡[2]、金丸 京子[2]、木村 真[2]、木村 哲哉[1]、小林 哲夫[2] ([1]三重大院生資、[2]名大院生命農)
○Emi KUNITAKE[1], Yi LI[2], Kyoko KANAMARU[2], Makoto KIMURA[2], Tetsuya KIMURA[1], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Mie Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspegillus nidulans* において、カーボンカタボライト抑制機構(CCR)には転写抑制因子 CreA を介した経路と cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PkaA)が関与する経路が存在する。アミラーゼの発現には前者が主要であるのに対し、セルラーゼは後者が主要であることを 2015 年度本大会(内田ら)で報告した。PkaA は G タンパク質を介して生成した cAMP により活性化し、下流のタンパク質をリン酸化するため、本研究では G タンパク質 α サブユニット(Gα)の CCR への関与について検証した。また、抑制炭素源の種類と CreA, PkaA, Gα との関係性についても検討したので併せて報告する。
【方法および結果】三種の Gα 遺伝子(*ganA*, *ganB*, *fadA*)のそれぞれの破壊がグルコースによるセルラーゼ生産抑制に与える影響をプレートアッセイで検討したところ、*ganB* 破壊で著しい抑制解除が認められた。そこで、セルラーゼ遺伝子発現抑制に与える *creA*, *pkaA*, *ganB* 破壊の影響を転写レベルで比較した。誘導物質であるセロビオース(3 mM)とグルコースのアナログである 2-デオキシ-D-グルコース(2.5 mM)を混在させて液体培養を行い、代表的なセルラーゼ遺伝子の発現レベルを RT-qPCR により解析した結果、*creA*, *pkaA*, *ganB* のそれぞれの破壊株においてほぼ同程度のセルラーゼ遺伝子の発現抑制解除が見られた。また、セルラーゼ遺伝子特異的な転写活性化因子 ClrB の遺伝子発現については *creA* 破壊で完全に抑制が解除されたが、*pkaA*, *ganB* 破壊株では顕著な影響は見られなかった。
　グルコース以外の様々な単糖によるセルラーゼ生産抑制に与える *creA*、*pkaA*、Gα 遺伝子破壊の影響をプレートアッセイにより解析した。その結果、野生株でのセルラーゼ生産はほぼ全ての単糖により抑制されたが、*pkaA* 破壊株ではグルコース、マンノース抑制の著しい解除、*creA* 破壊株では部分的なフルクトース抑制解除と、キシロース、アラビノース抑制の著しい解除が観察された。また、三種の Gα のうち *ganA* 破壊では影響は全く見られなかったが、*ganB* 破壊株ではグルコース、マンノース、フルクトース、キシロース、アラビノースと幅広い単糖の存在下で抑制解除が認められ、*fadA* 破壊株ではキシロースとアラビノースのみからの抑制解除が観察された。以上の結果は、Gα が PkaA 依存的だけでなく非依存的にも CCR に関わることを示すのみならず、抑制炭素源の種類により複数存在する抑制機構が異なった応答を示し、その合算により CCR の強度が決定されることを示唆している。
現在、他のバイオマス分解酵素の CCR についての知見を得るため、マンナン、キシランやペクチンなどについても検討しているところである。

carbon catabolite repression, G-protein, *Aspergillus nidulans*

講演番号：2A06a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A06 会場

麹菌のカーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による液体培養時の菌糸形態の制御
Effect of *creA* disruption on hyphal morphology in submerged culture of *Aspergillus oryzae*
○一瀬 桜子[1]、田中 瑞己[2]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院・農、[2]静県大・食栄)
○Sakurako ICHINOSE[1], Mizuki TANAKA[2], Takahiro SHINTANI[1], Katsuya GOMI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は多様な多糖類分解酵素を分泌生産する能力が高いものの、その生産性はカーボンカタボライト抑制（CCR）を受けることで著しく低下する。糸状菌における CCR 制御因子として、広域制御型転写因子 CreA が同定されている。糸状菌において、*creA* 変異株は野生株と比較して生育が悪化することが知られており、麹菌の *creA* 破壊株においても寒天培地上で生育させた結果、野生株よりも著しく生育が悪化することが観察された。しかし、液体培養して得られた菌体の乾燥菌体重量を測定した結果、*creA* 破壊株では野生株よりも 1.3 倍菌体量が増加していた。そこで、液体培養時の菌糸形態を観察した結果、野生株ではペレット状の形態を示すのに対し、*creA* 破壊株では菌糸が培地中に拡散するパルプ状の菌糸形態を示すことが観察された。そこで本研究では、*creA* 破壊株において液体培養時の菌糸形態の変化の要因を特定することを目的とした。

まず、*creA* 破壊による細胞壁成分への影響を解析するために、細胞壁構成多糖の成分解析を行った。その結果、*creA* 破壊株ではα-グルカン由来のグルコース量が野生株と比較して 2 倍以上増加していた。そこで、α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* の発現量を定量 PCR により解析した結果、*creA* 破壊株では *agsB* の発現量が野生株よりも 10 倍以上高かった。さらに、*agsB* は 2 つのα-アミラーゼ様遺伝子 *amyD* 及び *amyG* とクラスターを形成しており、AmyD と AmyG はそれぞれα-グルカンの分解と合成に関与していることが報告されている。そこで、*amyD* と *amyG* の発現量を解析した結果、*creA* 破壊株では *amyD* の発現量が野生株よりも 50 倍以上高い値を示した。そこで、*amyD* 破壊株及び *creA/amyD* 二重破壊株、*amyD* 高発現株を作製し、液体培養における菌糸形態を観察した。その結果、*amyD* 破壊株は野生株と同様にペレット状の形態を示すのに対し、*amyD* 高発現株では *creA* 破壊株と同様のパルプ状、一方 *creA/amyD* 二重破壊株では野生株よりも小さなペレット状の菌糸形態を示すことから、AmyD は *creA* 破壊株の菌糸形態の変化に関与することが示唆された。そこで、各株における細胞壁中のα-グルカン量を測定した結果、*amyD* 破壊株と *amyD* 高発現株は野生株と、さらに *creA/amyD* 二重破壊株は *creA* 破壊株とほぼ同等のα-グルカン量を示したことから、*amyD* の破壊と高発現は細胞壁中のα-グルカン量には影響を及ぼさないことが示唆された。現在は *creA* 破壊株における *amyD* 高発現の菌糸形態への影響を検討するために、各株のα-グルカンの鎖長を解析しているところである。

Aspergillus oryzae, carbon catabolite repression, hyphal morphology

発表責任者：一瀬桜子（sakurako.ichinose.q2@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A06a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A06 会場

Aspergillus fumigatus の銅代謝機構の解析
Functional analysis of copper metabolism in *Aspergillus fumigatus*
○楠屋 陽子[1]、辺 彩[1]、萩原 大祐[2]、矢口 貴志[1]、高橋 弘喜[1,3] ([1]千葉大 真菌センター、[2]筑波大 生命環境系、[3]千葉大 分子キラリティー)
○Yoko KUSUYA[1], Cai BIAN[1], Daisuke HAGIWARA[2], Takashi YAGUCHI[1], Hiroki TAKAHASHI[1,3] ([1]MMRC., Chiba Univ., [2]Life Env. Sci., Tsukuba Univ., [3]MCRC., Chiba Univ.)

必須金属である銅は細胞内の多岐にわたる酵素･タンパク質が正常に働くために必要不可欠である。その一方で、銅の過剰な蓄積は生体にとって有害となるため、その濃度は厳密に制御されている。アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* の宿主への感染においても、宿主内の銅濃度を感知して細胞内の銅濃度を恒常的に維持することが必要となる。我々は、*A. fumigatus* の銅制御機構を解明するために、転写因子 *Afmac1* (Afu1g13190)および *aceA* (Afu6g07780)の機能解析を進めた。*Afmac1* の遺伝子破壊株では、銅欠乏時に著しい生育の低下を示し、最小培地においては、分生子の連鎖が短く、メラニン色素の蓄積が低い胞子が観察された。一方、*aceA* の遺伝子破壊株は、銅に対して高い感受性を示した。RNA-seq 法を用いたトランスクリプトーム解析からは、銅欠乏時に *Afmac1* が銅を取り込むのに必要な金属還元酵素やトランスポーターの遺伝子発現を活性化し、細胞外の銅濃度が高い時には *aceA* が細胞内の銅濃度を下げるために必要なトランスポーターの活性化と *Afmac1* が活性化する遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。これらの結果から、*Afmac1* が銅の獲得機構を、*aceA* が銅の解毒化機構を制御する転写因子として機能していることが示唆された。これらのデータを元に、銅代謝制御の全体像と、関連する転写因子の機能について報告したい。

Aspergillus fumigatus, Copper, Transcription factor

講演番号：2A06a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A06 会場

窒素源が *Fusarium graminearum* に与えるトリコテセン産生への影響
The effect of nitrogen source on trichothecene production by *Fusarium graminearum*
○塩原 拓也[1]、中嶋 佑一[1]、赤坂 まな美[1]、前田 一行[2]、鬼頭 良幸[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、木村 真[1] ([1]名古屋大院生命農、[2]明治大院農)
○ Takuya SHIOBARA[1], Yuichi NAKAJIMA[1], Manami AKASAKA[1], Kazuyuki MAEDA[2], Yoshiyuki KITOU[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景と目的】
Fusarium graminearum は pH、糖、水分活性、窒素源などの環境要因を感知し、トリコテセン生合成遺伝子（*Tri* 遺伝子）の発現を制御している。Gardiner らは、アグマチン硫酸塩をはじめとするポリアミンを窒素源とすると、*F. graminearum* が大量のトリコテセン毒素を産生することを明らかにした。しかし、アグマチン硫酸塩がどのように毒素産生を促進しているのか未だに解明されていない。本研究では、*F. graminearum* がアグマチン硫酸塩を代謝する際の毒素産生促進機構の解明を目的として実験を行った。
【方法】
Gardiner らの最小培地（*Fungal Genet Biol* **46**: 604-613, 2009）に準拠して炭素源をスクロース、窒素源をそれぞれグルタミン、硝酸塩、アグマチンのいずれかとした培地を作製し、*F. graminearum* JCM9873 株（15-ADON 型）を植菌した。グルタミン含有培地と硝酸塩含有培地の pH をアグマチン含有培地の pH に調節し続けながら 6 日間培養し、その毒素産生量を HPLC で測定した。また、アグマチン培地を用いた培養液の経時的 pH 変化をモニターし、それと同じになるようにグルタミン培養液の pH を塩酸および水酸化カリウムを用いて合わせ続けた。これらの培養菌体から RNA を抽出し、トリコテセン生合成遺伝子の発現を培養 48 時間目、72 時間目にノーザンブロッティングを用いて解析した。
【結果および考察】
硝酸塩を窒素源とした培地で *F. graminearum* を培養すると、毒素産生は見られなかった、しかし pH が上がらないように調整することで毒素を産生するようになった。同様にグルタミンを窒素源とした培地を用いた際、アグマチン含有培地と比較して毒素産生量は減少した。しかし、アグマチン培地の pH 変化に合わせてグルタミン含有培地の pH を調節したところ、大量の毒素を産生したことが分かった。そこで、ノーザンブロッティンによって主要なトリコテセン生合成遺伝子である *Tri4*、*Tri5*、*Tri6* の発現量を解析したところ、グルタミン培地での各遺伝子の転写量は、アグマチン含有培地と同程度であった。これらの結果から、アグマチンは *F. graminearum* の毒素産生を真に促進するのではなく、アグマチンを代謝した際に培地中に残る硫酸イオンによる pH の低下が毒素産生を誘導しているのではないかと考えられる。

Fusarium graminearum, trichothecene biosynthesis, secondary metabolism

発表責任者：木村真（mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A06a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A06 会場

Fusarium graminearum における特定のアミノ酸代謝がトリコテセン生産制御に及ぼす影響
The effect of metabolism of specific amino acids on regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*.

○中嶋 佑一[1]、前田 一行[2]、塩原 拓也[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、西内 巧[3]、木村 真[1]([1]名古屋大院生命農、[2]明治大院農、[3]金沢大 学際科学)
○Yuichi NAKAJIMA[1], Kazuyuki MAEDA[2], Takuya SHIOBARA[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Takumi NISHIUCHI[3], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meiji Univ., [3]Kanazawa Univ.)

【研究の背景】
重要穀類に感染する植物病原菌 *Fusarium graminearum* はトリコテセン系かび毒（毒素）を生産して穀粒を汚染し、質、量の両面から食の安全を脅かす。穀類の毒素低減化に向けた我々のこれまでの研究から、玄米粉固体培養時にトレオニン （Thr）を添加することで *F. graminearum* の毒素生産が抑制されること、Thr 添加によって毒素生合成（*Tri*）遺伝子群が転写レベルで抑制されることを見出している。本研究では特定のアミノ酸の処理によるトリコテセン生合成の抑制機構を明らかにすることを目的に、関与する候補遺伝子の探索、発現解析、破壊株作製・解析を行った。
【結果と考察】
玄米粉固体培養時の Thr 添加区において培養初期過程特異的に発現が変化する遺伝子群を定量的 RT-PCR によって調査したところ、Thr 代謝系に関わる遺伝子群では threonine aldolases (TAs: *FGSG_05335* および *FGSG_12344*) や glycine decarboxylase P subunit (GCV2) をコードする遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。TAs の破壊株を作出したところ、*FGSG_05335* の破壊体の生育は野生株と変わらなかったのに対し、*FGSG_12344* の破壊体では Thr の資化能が大幅に低下し、固体培養時での Thr 添加区において野生株よりも毒素生産が抑制されにくくなった。この結果は TA を介した Thr 代謝がトリコテセン生産抑制効果を生み出していることを示唆していた。一般的に Thr 代謝の過程で TA は Thr をグリシン（Gly）へと変換し、代謝を進行させる。そこで続いて起こる Gly 代謝の影響を調べるため、Thr 添加で発現上昇が認められた GCV2 の遺伝子破壊を試みた。得られた遺伝子破壊株は Thr や Gly を唯一の窒素源とした培地でほとんど生育できず、Gly の代謝能をほぼ欠質していることが確認された。また、本遺伝子破壊株は玄米固体培地で生育は可能であったものの、Thr や Gly を添加した際に生育の阻害が認められた。このような生育阻害の原因として、本遺伝子破壊株はグリシン開裂系の機能が欠損することから、Gly をセリン（Ser）へと変換してゆく過程で 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸が枯渇することが生育阻害の原因となることが予想された。
現在、このグリシン開裂系欠損株において Thr や Gly 添加時の毒素生産やヒストン修飾状況を調べている。
【謝辞】
本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受け行われたものである。

Fusarium graminearum, Trichothrcene biosynthesis, Threonine metabolism

発表責任者：木村 真（mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A06a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A06 会場

麹菌の染色体重複株から見出した二次代謝系クラスター制御因子の解析
Analysis of novel regulatory factors of sencondary metabolite clusters in *Aspergillus oryzae*
○高橋 理、篠原 靖智、小山 泰二 (野田産研)
○Tadashi TAKAHASHI, Yasutomo SHINOHARA, Yasuji KOYAMA (NISR)

我々は麹菌の染色体の任意の領域を数 Mb レベルで重複させる技術を確立した（1,2)。染色体の重複株では、重複領域内の遺伝子の多くの発現が上昇するため（2)、表現型を追うことで、その原因となる因子のスクリーニングが可能である。麹菌は多数の二次代謝クラスターを保持しているが、その多くは発現しておらず、制御系も不明である。そこで RIB40 株の染色体の部分重複株のライブラリーを作製し、表現型を調べたところ、7 番染色体の 1.2Mb の領域の重複株で、2 番染色体の末端に位置するアスピロクロリン生合成遺伝子クラスターの顕著な発現上昇が観察された。解析の結果、クラスターの制御に関わる因子として 7 番染色体上の重複領域中の *traA* と *smr1* を特定した。*traA* の強制発現株では、アスピロクロリン生合成クラスターに加えて、その隣に位置する *wyk1* 遺伝子クラスター（3）など複数のクラスターの発現上昇が見られ、RIB40 株では生産されていない WYK1(DPPIV インヒビター）（3）の生産が確認された。*smr1* については当初、抑制因子と考えていたが、強制発現ではなく、コピー数を増加させて発現を上昇させた実験の結果、*traA* と同様に正の制御因子としても働いていることが判明した。また、アスピロクロリンクラスター内に位置する正の制御因子である *aclZ* の破壊株でも、WYK1 の生産が確認されたことから、*aclZ* は WYK1 クラスターの抑制因子としての機能も担っていることが示唆された。また *traA* の高発現株では *aclZ* の発現が上昇することから、*traA* が上位に位置するものと考えられる。

1) Takahashi et al. Targeted tandem duplication of a large chromosomal segment in *Aspergillus oryzae*. 2014. Appl. Environ. Microbiol. **80**:4547-58
2) 麹菌染色体の大規模多コピー重複株の作製と表現型の解析　農芸化学会 2016 年度大会
3) Imamura et al. Identification of a gene involved in the synthesis of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor in Aspergillus oryzae. 2012. Appl. Environ. Microbiol. **78**:6996-7002.

Aspergillus oryzae, secondary metabolism, gene regulation

発表責任者：高橋　理（ttakahashi@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：2A06a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A06 会場

放線菌の長鎖 mRNA の発現情報取得の新規アプローチ ～二次代謝産物生合成遺伝子群の発現をありのまま捉える～

Challenge to obtain full-length transcript sequences for discovering real expression of secondary metabolite biosynthetic genes in *Actinobacteria*

○菅野 学[1]、三谷 恭雄[1]、野田 尚宏[2]、木村 信忠[1]、田村 具博[1] ([1]産総研・生物プロセス、[2]産総研・バイオメディカル)
○ Manabu KANNO[1], Yasuo MITANI[1], Naohiro NODA[2], Nobutada KIMURA[1], Tomohiro TAMURA[1] ([1]AIST-BPRI, [2]AIST-BMRI)

微生物の二次代謝産物生合成の発現挙動の理解は、新規な生理活性物質の探索や高付加価値な二次代謝産物の微生物生産を効率化するうえで極めて重要である。これまでに知られる微生物由来の生理活性物質の半数以上は、細菌の 1 分類群である放線菌から発見された。*Streptomyces* 属放線菌のゲノムの 5-10％は二次代謝産物生合成遺伝子群のクラスター（約 30 以上）で占められており、クラスター長は 5kb 程度から 100kb を超えるものまであり、一般に数 kb から数十 kb の複数のオペロンから構成される。モデル放線菌である *Streptomyces coelicolor* A3(2)株は、2002 年に全ゲノム配列が決定され[1]、2016 年に転写開始位置の詳細な解析結果が報告された[2]。興味深いことに、長年研究されたモデル放線菌株であっても、ゲノム上の二次代謝産物生合成遺伝子群の半数以上は、研究室の培養条件下では発現されないまま未探索であることが明らかとなった。研究を加速化するうえで、放線菌の二次代謝産物生産を司る長鎖 mRNA の発現を高精度に調べる基盤技術の開発が不可欠となっている。

近年になって、次世代シーケンサー（NGS）の登場と解析技術の進展により、微生物のゲノム中に存在する各遺伝子の発現レベルを簡便かつ網羅的に調べることが可能となった。既存のトランスクリプトーム解析で汎用されるイルミナ社の NGS は、データ量に優れるため、遺伝子発現の定量的な評価に適する。しかし一方で、上述の NGS は 1 リード長が数百 bp と短いために、シーケンスデータの機能推定にはゲノム配列へのマッピングや de novo アセンブルが必要である。すなわち、既存の解析手法では、数 kb を超える転写産物の全長をありのままに把握することは困難と言える。特に、１つの二次代謝産物生合成遺伝子群における各ポリシストロニック mRNA の発現単位のばらつき（転写開始位置や転写終結位置の不均一性）を、１分子レベルで捉えることは不可能である。

このような背景から、我々は、長鎖 mRNA の発現情報の取得に優れた解析手法の開発を目的に、その端緒となる基礎的検討を実施した。本発表では、二次代謝産物の生産が誘導される条件にて培養した *S. coelicolor* A3(2)株の菌体を用いて、(1)RNA 抽出工程の検討、(2)cDNA 調製手法の改良、(3)リード長の長い１分子リアルタイムシーケンサーを含めた NGS 機種間の解析データの比較に取り組んだ結果を報告する。得られた知見を参考に各要素技術を組み合わせることで、新規手法が確立され、微生物の長鎖 mRNA の発現実態の解明に貢献するものと期待される。

[1] Bentley *et al*., Nature. 2002. 417:141-147. [2] Jeong *et al*., Nature Communications. 2016. 7.

本研究は、NEDO スマートセルプロジェクトの支援を受けて行われました。

RNA extraction, cDNA synthesis, *Streptomyces coelicolor* A3(2)

発表責任者：菅野学（manabu-kanno@aist.go.jp）

講演番号：2A06a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A06 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成を制御する σ 因子 FliA の機能解析

Functional analysis of FliA-family sigma factors which control gene expression for sporangium formation in *Actinoplanes missouriensis*

○橋口 優一朗、手塚 武揚、大西 康夫（東大院・農生科・応生工）
○Yuichiro HASHIGUCHI, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では栄養菌糸を形成して増殖し、栄養飢餓状態に陥ると、べん毛を有する胞子が多数内包された胞子嚢を形成する。胞子嚢は水に触れることで開裂し、胞子が放出される。放出された胞子はべん毛により水中を運動する遊走子となり、栄養が豊富な環境に辿り着くと、発芽して再び栄養菌糸を形成する。べん毛に関して多方面から研究されているサルモネラ菌では、σ 因子 FliA によって一部のべん毛遺伝子の転写が制御されていることが知られている。我々のこれまでの研究により、*A. missouriensis* のもつ全てのべん毛遺伝子のプロモーター領域にはサルモネラ菌において決定された FliA 認識配列と相同性の高い配列が保存されていることが示されていた。また、胞子嚢形成時や胞子嚢開裂時に転写が活性化される遺伝子の多くが同様のプロモーター配列を有することも示されており、*A. missouriensis* においては、FliA ホモログがべん毛遺伝子群だけではなく、胞子嚢形成や胞子嚢開裂に関わる多くの遺伝子の発現を制御していることが予想された。そこで本研究では、*A. missouriensis* の *fliA* ホモログの機能の解明を目指した。
【方法・結果】サルモネラ菌の FliA をクエリーとして、*A. missouriensis* のゲノム上から相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を探索し、4 つの遺伝子 *fliA1*、*fliA2*、*fliA3*、*fliA4* を見出した。過去に行った RNA-seq 解析によると、*fliA4* は胞子嚢形成・開裂を通して、ほとんど発現していなかったのに対し、*fliA1* は胞子嚢形成後期、*fliA2* は胞子嚢形成初期、*fliA3* は胞子嚢開裂過程で転写量が増加していた。そこで、*fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の破壊株を構築し、野生株と表現型を比較したところ、*fliA2* 破壊株において、遊走子の遊泳速度が約半分に低下している様子が観察され、べん毛形成あるいはべん毛の回転運動に何らかの異常が生じていることが示唆された。*fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の破壊株のべん毛遺伝子群の転写解析を行ったところ、*fliA2* 破壊株では全てのべん毛遺伝子の転写量が半分前後に低下しており、*fliA1*、*fliA3* の破壊株でもいくつかのべん毛遺伝子の転写量が低下していたことから、3 つの FliA が制御する遺伝子の一部は重複していると考えられた。そこで *fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の多重破壊株を構築したところ、*fliA1* と *fliA2* の二重破壊株では胞子嚢の形状に異常が見られ、胞子嚢開裂も起こりにくくなるとともに、放出された遊走子も全く運動性を示さなかった。以上の結果より、3 つの FliA ホモログがべん毛遺伝子群および胞子嚢形成・開裂に関わる多くの遺伝子の発現に関与していること、FliA1 と FliA2 が正常な機能を有する胞子嚢を形成する過程において中心的な役割を担っていることが示された。現在、*fliA1* と *fliA2* の単独破壊株および二重破壊株の RNA-seq 解析を進めている。

Actinoplanes missouriensis, flagella biosynthesis, FliA

発表責任者：橋口優一朗（yuichiro-1010@outlook.jp）

講演番号：2A06a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A06 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のべん毛形成に必須な遺伝子 *AMIS1780* の同定と機能解析

Identification and functional analysis of an essential gene (*AMIS_1780*) for flagellar biogenesis in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[2]、○前田 聡史[1]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工)
Takeaki TEZUKA[2], ○Satoshi MAEDA[1], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では基底菌糸を伸長して増殖するが栄養飢餓状態になると基底菌糸から短い胞子嚢柄を介して多数の胞子を内包する胞子嚢を数多く形成して休眠する。胞子嚢は水分などの外界からのシグナルを感知すると開裂し、外界に放出された胞子はべん毛運動を行う遊走子となり水中を泳ぎ回る。*A. missouriensis* はこのように複雑な形態分化を伴う生活環を有するが、その制御機構の詳細は解明されていない。我々はこれまでに、胞子嚢形成に関わる遺伝子の同定を目的として RNA-Seq 解析を行い、胞子嚢形成開始前に比べて胞子嚢形成初期に転写量が大幅に増大し、かつ *Actinoplanes* 属放線菌に広く保存されている遺伝子群を抽出し、その機能解析を進めてきた。本研究では、これら胞子嚢形成に関わると予想された遺伝子群のうち 10 遺伝子の機能解析を行った。
【方法・結果】10 遺伝子を個々に野生株のゲノム上から欠失させた遺伝子破壊株を作製し、その表現型を野生株と比較したところ、*AMIS_1780* 破壊株では胞子嚢の形状と開裂に野生株との差異は見られなかったものの、胞子嚢から放出される胞子の数が野生株の約 10%程度にまで低下していることが明らかになった。また、光学顕微鏡観察により、胞子嚢から放出された胞子は、べん毛遺伝子破壊株の胞子と同様に、完全に運動性を失っていることがわかった。さらに、電子顕微鏡観察によって、放出された胞子は、べん毛を持っていないことが示された。*AMIS_1780* 遺伝子の相補株を作製したところ、胞子嚢から放出された遊走子は、野生株に比べて遊走速度や遊走している細胞の割合は低下しているものの遊走能を示し、電子顕微鏡観察によりべん毛が形成されていることも確認された。

次に、*AMIS_1780* 破壊株において、べん毛形成のどの段階で異常が生じているかを特定するため、胞子嚢形成条件で培養した破壊株および野生株からタンパク質を抽出して二次元電気泳動を行い、両株のプロテオームを比較した結果、*AMIS_1780* 破壊株ではべん毛フィラメントを構成する FliC が全く検出されなかった。したがって *AMIS_1780* はべん毛遺伝子群のうち少なくとも *fliC* の発現に必須な遺伝子であることが示された。

AMIS_1780 は全長 204 残基のタンパク質であり、ほぼ全長がリボフラビン合成酵素 RibD の C 末端側ドメインと有意に相同性を示す。RibD の C 末端側ドメインのみからなるタンパク質はバクテリアにおいて広く存在するが、その機能は全くわかっていない。現在、*AMIS_1780* 破壊株のべん毛遺伝子群の転写の有無を解析しており、それについても合わせて発表する。

Actinoplanes missouriensis, Flagellar biogenesis, Zoospore

講演番号：2A06a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A06 会場

放線菌 *Streptomyces griseus* が保有する呼吸鎖複合体 II の銅イオン濃度特異的な転写制御

Copper ion concentration-dependent transcriptional control of respiratory chain complex II of *Streptomyces griseus*

○高原 薫平、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科）
○Kunpei TAKAHARA, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

【目的】我々は、放線菌の形態分化と抗生物質生産が微量の銅イオンの添加によって促進される現象について、その分子メカニズムの解明を進めてきた。その過程において、銅を要求する末端呼吸鎖複合体 IV の活性および細胞内 ATP レベルが、分化の開始に重要な役割を担うことを明らかとした。さらに、DNA マイクロアレイ解析を通じて *S. griseus* の銅イオン応答性遺伝子群を同定し、それらの役割および発現制御メカニズムの解明を進めている。ここでは、銅イオン添加によって転写が抑制される呼吸鎖複合体 II(succinate dehydrogenase; Sdh)オペロンについて、その役割および調節機構を解明することを目的とした。

【結果及び考察】上述の DNA マイクロアレイ解析の結果、10 μM の銅イオンの添加により転写レベルが低下する遺伝子の一つとして、酸化的リン酸化に関わる呼吸鎖複合体 II をコードする *sdh2* オペロン(*SGR705*～*SGR707*)が同定された。本オペロンに LysR 型転写調節蛋白質をコードする SGR708 が隣接する遺伝子の配置は *Streptomyces* 属に広く保存されていたことから、SGR708 が *sdh2* オペロンの発現制御に関与することが予想された。相同組み換えを利用した薬剤耐性遺伝子との置換により *SGR708* 遺伝子破壊株を作製し、各遺伝子の転写レベルをセミ定量 RT-PCR により解析した。その結果、DNA マイクロアレイ解析の結果と一致して、野生株では銅イオンの添加で *sdh2* の転写量の低下が確認された。一方、*SGR708* 破壊株では銅添加の有無に関わらず *sdh2* の転写は低レベルであった。さらに、大腸菌を宿主として調製した SGR708 組換え蛋白質を、*sdh2* プロモーター領域をプローブとするゲルシフトアッセイに供したところ、本蛋白質は *sdh2* プロモーター領域に結合し、その結合能は銅イオンの添加によって失われることが明らかとなった。このことから、SGR708 は低銅濃度下で *sdh2* オペロンの発現を正に制御するローカルレギュレーターとして機能することが示唆された。また、*S. griseus* が保有するもう一つの呼吸鎖複合体 II オペロン *sdh1*(*SGR2687*～*SGR2690*)は、野生株と *SGR708* 破壊株の双方において銅添加の有無に関わらず転写されていた。以上の結果から、*S. griseus* が有する 2 つの呼吸鎖複合体 II は、Sdh1 が構成型であるのに対し、Sdh2 は銅欠乏時特異的に発現する誘導型であり、後者の転写は SGR708 により制御されると考えられた。銅欠乏時では末端呼吸鎖複合体 IV の活性が低下することから、Sdh2 はそれを補う役割を担うと推測される。なお、今回同定された遺伝子群の中には銅耐性に関する遺伝子は含まれていなかったことから、10 μM という濃度は銅イオンの充足条件として適した濃度であることが予想された。

Streptomyces, copper, metabolism

講演番号：2A06a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A06 会場

細菌型光センサーClass III LitR の光受容に関わるシステイン残基の解析
Analysis of the cysteine residues involved in the photo-sensing by the bacterial photo-sensor Class III LitR
○角 悟、高野（白鳥） 初美、上田 賢志、高野 英晃（日大・生資科・生命研）
○Saotru SUMI, Hatsumi Takano-Shiratori, kenji Ueda, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

【目的】細菌型光センサーLitR は光依存的な転写調節を担う蛋白質であり、その光受容ドメインの構造から複数の Class に分類される。我々は前大会で Class III LitR を保有する土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 の青色光による葉酸合成促進メカニズムについて発表した。その制御に関与する Class III LitR の組換え蛋白質には 340 nm の単一の極大吸収が認められ、それが光照射により消失し、暗条件に戻すことで徐々に回復していく光サイクルを有していることを明らかにした。本研究では、Class III LitR の光受容に関与するドメインおよびアミノ酸残基について検証を進めた。
【結果・考察】はじめに、LitR の分子量を推定するため、LitR の組換え蛋白質をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。暗条件下では検量線の上限を超えるピークと 4 量体と推定されるものが検出された。一方、光照射した同標品では 4 量体のピークのみが認められた。このことから、LitR は光照射の有無に関わらず 4 量体を形成することが推測された。次に、光受容ドメインの特定を行った。本蛋白質は、N 末端側に DNA 結合ドメインを有していることが推定されているが、340 nm の極大吸収の由来となるクロモフォアおよびその結合領域が不明である。そこで、クロモフォアの結合領域を推定するため、N 末端側領域または C 末端側領域を除いた変異体を作製した。その吸光スペクトルを測定したところ、C 末端領域において野生型と同様に 340 nm の極大吸収が認められ、180 秒の光照射によりそのピークは消失した。一方で、N 末端領域にはその極大吸収が検出されなかった。以上のことから、340 nm の極大吸収は C 末端側領域に由来することがわかった。

そこで次に、LitR 蛋白質からアンテナ分子の単離を試みたが、その取得には至っていない。そこで、変性剤等の効果を調査することで、情報を収集することを試みた。同標品に SDS を添加したところ、340 nm のピークが 300 nm 側にシフトし、さらにメルカプトエタノールを添加するとそのピークは消失した。このことから、光受容ドメインはジスルフィド結合を含んだ立体構造に強く依存することが示唆された。次に、Cys 残基を Ala に置換した変異体を作製した。Class III LitR の C 末端側領域には 3 つの Cys 残基が保存されており、それらが光受容ドメインの構造形成に関与していると予想した。作出した変異体の吸光スペクトルを測定したところ、3 箇所の Cys における変異体全てにおいて 340 nm の極大吸収が消失していた。さらに、これらの変異体についてゲルシフトアッセイによる DNA 結合能を解析したところ、いずれもその能力が低下していることが認められた。以上のことから、3 つの Cys 残基が光受容に中心的役割を果たす構造形成に必須の役割を有することが示された。

LitR, Cysteine, Burkholderia

講演番号：2A06a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A06 会場

Gordonia 属細菌の光依存的なカロテノイド生産メカニズムの解析
Analysis of light-inducible carotenoid production in *Gordonia*
榮山 新、田島 侑、荒木 知珠、角 悟、高野 初美、上田 賢志、○高野 英晃（日大生資科・生命研）
Arata SAKIYAMA, Yu TAJIMA, Tomomi ARAKI, Satoru SUMI, Hatsumi TAKANO, Kenji UEDA, ○Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

[目的]我々はこれまでに非光合成細菌の光応答に関する研究を進め、ビタミン B12 をアンテナ分子として利用する光センサー型転写調節タンパク質 LitR ファミリーの機能と役割を明らかにしてきた。LitR ファミリー類似遺伝子は広範な細菌種ゲノムに保存されている。このことは非光合成細菌における光感知機構が多様であることを示唆している。本研究では、光依存的なカロテノイド色素生産が報告(AEM(2005)71:5077)されている一方で、既知タイプの光センサーがゲノム上から見出されないグラム陽性 *Corynebacteriales* に属する *Gordonia* 属細菌の光応答の一般性を調査するとともに、ゴム分解菌 *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株の光応答に関わる遺伝子の同定を目的とした。
[結果] 公的分譲機関より取り寄せた *Gordonia* 属細菌群を明・暗条件下において培養し、カロテノイドと予想される黄色色素生産を観察した。その結果、*G. polyisoprenivorans* VH2、*G. polyisoprenivorans* NBRC 16320、*G. bronchialis* NBRC 16047、*G. rubripertincta* NBRC 101908、*G. terrae* NBRC 100016 は暗条件においては白色コロニーを形成した一方、明条件ではコロニーは黄色を呈していた。光依存的なカロテノイド生産が *Gordonia* 属細菌に一般的あることが判明したため、本属の遺伝学的なモデル株 *G. polyisoprenivorans* VH2 株を対象として、光誘導性遺伝子の同定を目的とした DNA マイクロアレイ解析を行った。光照射によって転写レベルが上昇する遺伝子として、カロテノイド様合成遺伝子クラスター、光回復酵素 *phr*、シャペロニン *groEL*、RNA ポリメラーゼシグマ因子 *sigK* が同定された。それらの転写は 7.6 から 53.4 倍まで光照射によって著しく促進された。ここで見出したカロテノイド様合成遺伝子クラスターのプロモーター領域には *Mycobacterium tuberculosis* の σ^K 認識コンセンサス配列が存在していた。また、*sigK* や *phr* などは多くの *Gordonia* 属類縁菌においてオペロンもしくはクラスターを形成して高く保存されていた。このことは、σ^K が *G. polyisorenivorans* VH2 株の光誘導性カロテノイド生産に関与し、類似の制御システムが放線菌群に広く備わっていることを示唆している。

carotenoid, Gordonis, photosensor

講演番号：2A06p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A06 会場

DIT1 ターミネーターと２つの RNA 結合タンパク質による目的タンパク質の増産

Enhancement of protein production via the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in Saccharomyces cerevisiae

○松山 崇[1]、伊藤 洋一郎[1]、北川 孝雄[2]、山西 守[2]、片平 悟史[1]、井沢 真吾[3]、入江 賢児[4]、清木 誠[2] ([1]豊田中研、[2]山口大医、[3]京都工繊大、[4]筑波大)

○Takashi MATSUYAMA[1], Yoichiro ITO[1], Takao KITAGAWA[2], Mamoru YAMANISHI[2], Satoshi KATAHIRA[1], Shingo IZAWA[3], Kenji IRIE[4], Makoto SEIKI[2] ([1]TOYOTA R&D Labs., Inc., [2]Yamaguchi Univ., [3]Kyoto Inst. Of Tech., [4]Tsukuba Univ.)

代謝工学的な手法を用いて、バイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する遺伝子組換え酵母を育種するには、目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子を導入し、強力に発現させることが求められる。

遺伝子のターミネーター領域は、転写の終了や polyA の付加などの役割に加え、3'-UTR の部分が、mRNA 半減期・翻訳効率・細胞内局在等の制御を通じて遺伝子発現を調節する。これまで発表者らは、出芽酵母の 5,302 種類のターミネーター領域（全体の約 90%）について、ターミネーター領域の上流にコードされた目的タンパク質の生産量を増減させる活性を網羅的に評価した[1]。続いて上位 5 種類の高活性ターミネーターについて、プロモーター、レポーター、培地の炭素源などの違いが活性に与える影響を解析した結果、ほぼ全ての条件の下で *DIT1* ターミネーター（*DIT1t*）の活性が最も強く、標準的な *PGK1t* と比較して、上流の目的タンパク質の生産量が 2 倍以上になることを明らかにした[2]。

今回の報告では、上述の研究を進めていくうちに *DIT1* ターミネーターを活性化する因子の存在が推論されたため、逆遺伝学的な方法によって 2 種類の *DIT1t* 活性化遺伝子を同定した[3]。両者とも RNA 結合タンパク質{*NAB6* 遺伝子（Nucleic acid-binding protein 6）と *PAP1* 遺伝子（poly(A) RNA polymerase）}であり、作業仮説に合うと考えられた。遺伝学的な解析などから、*DIT1t* の 3'-UTR 部分の *cis* 配列 GUUCG/U に RNA 結合タンパク質 Nab6p が結合し、Nab6p が Pap1p をリクルートして、*DIT1t* の上流にコードされた目的タンパク質の生産を増産することを明らかにした[3]。

NAB6 と *PAP1* の過剰発現によって、生育は遅くなるものの、*DIT1t* 上流の目的タンパク質の生産量は 2.5 倍増加し、標準的な発現系の 5 倍となった。さらに *DIT1* ターミネーター配列に変異を導入し、活性を高める変異を集積した。その結果、変異型 *DIT1t*-d22 は、生育に影響を与えることなく、最大で野生型 *DIT1t* の 1.5 倍の増産活性を示した。

1) Yamanishi M, et al.: ACS Synth Biol, 2, 337-347. (2013)
2) Ito Y., et al.: J Biotechnol, 168, 486-492. (2013)
3) Ito Y., et al.: Sci Rep, 6, 36997. (2016)

terminator, post-transcriptional regulation, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：松山崇（e1215@mosk.tytlabs.co.jp）

講演番号：2A06p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A06 会場

Thermus thermophilus を宿主とするシリカ誘導性異種タンパク質発現システムの構築
Silica-inducible heterologous expression system in *Thermus thermophilus*
○藤野 泰寛、渡邉 修平、土居 克実（九大院農）
○Yasuhiro FUJINO, Shuhei WATANABE, Katsumi DOI (Kyushu Univ.)

【目的】好熱菌由来の酵素はその熱安定性から産業利用において重要である。一般的にこれらの耐熱性酵素は大腸菌などの常温菌の異種タンパク質発現系を用いて大量調製されるが、耐熱性酵素は正しい構造を保持できないまま発現されることが多く、好熱菌を宿主とするタンパク質発現系の構築が望まれている。我々の研究グループでは、高度好熱性細菌である *Thermus* 属細菌を過飽和シリカに曝露することで鉄結合性 ABC transporter が著量発現されることを見出した。そこで、この強力なシリカ誘導性プロモーターを利用した、*Thermus* 属細菌を宿主とする異種タンパク質発現系の構築を試みた。
【実験方法】*T. thermophilus* HB27 及びハイグロマイシン耐性遺伝子を保持したプラスミド pYK596 を使用し、pYK596 にシリカ誘導性タンパク質の推定プロモーター領域(約 600 bp)及びマルチクローニングサイトを挿入した pSix1 を構築した。次いで、pSix1 のプロモーター直下に *Thermus* sp. A4 由来 β-galactosidase (β-gal)遺伝子を挿入したβ-gal/pSix1 を構築し、*T. thermophilus* HB27 を形質転換した。これらの形質転換体を 100 μg/ml ハイグロマイシンを含む TR 培地(0.4% Tryptone, 0.2% Yeast extract, 0.1% NaCl)または終濃度 400 – 600ppm のシリカを添加した TR 培地を用い、70°C で振盪培養した。経時的に培養液を分取し、β-gal 活性を Miller Unit (MU)にて測定した。また、超音波破砕後の上清中の総タンパクに対するβ-gal 比活性(1 Unit = 1 nmol(*o*-nitrophenol liberated) min^{-1} (mg protein)$^{-1}$)を測定した。
【結果及び考察】pSix1 で形質転換した HB27 株は 100 MU 程度のβ-gal 活性を示したが、これは HB27 株が持つ background のβ-gal 活性であると推測された。また、β-gal/pSix1 を持つ HB27 株を TR 培地で培養した場合には約 500 MU を示し、若干 leaky な発現が起こっていることが明らかとなった。一方、400ppm 及び 600ppm シリカ含有 TR 培地で培養した場合、24 時間後のβ-gal 活性はそれぞれ 1500 MU、2200 MU となり、シリカ添加による発現誘導が確認された。このシリカ曝露による発現誘導は、培養 2 時間後には確認され、本プロモーターはシリカ曝露に迅速に応答すると思われる。一方、対数増殖期まで TR 培地で培養して、シリカ含有 TR 培地に培地交換を行ったところ、2 時間後のβ-gal 活性は 1000 MU 程度に留まった。これは、TR 培地での増殖中に細胞が鉄を貯蔵し、シリカ添加による鉄欠乏の影響が低減されたためであると考えられる。また、24 時間培養後の上清におけるβ-gal 比活性は、それぞれ pSix1(TR 培地)：15 U、β-gal/pSix1(TR 培地)：125 U、β-gal/pSix1(400ppm シリカ含有 TR 培地)：281 U、β-gal/pSix1(600ppm シリカ含有 TR 培地)：422 U であり、いずれもシリカ添加による発現誘導が確かめられた。

silica, *Thermus thermophilus*, expression

発表責任者：藤野　泰寛（fusion@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A06p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A06 会場

枯草菌における異種プロモーター認識能拡張の取り組み

Study of extending recognition ability of heterologous promoters in *Bacillus subtilis*

○渡辺 葵、山下 園加、井上 拓也、吉川 博文、朝井 計（東京農大院バイオ）
○Aoi Watanabe, Sonoka Yamashita, Takuya Inoue, Hirofumi Yoshikawa, Kei Asai (Tokyo Univ. Agric.)

【背景】枯草菌は形質転換能や物質分泌性に優れ、難培養生物などの有用物質をコードする遺伝子を導入・発現させるといった遺伝子資源活用のための良い宿主となり得る。しかしながら枯草菌は転写・翻訳の両者において極めて厳密な制御機構を持っており、異種遺伝子の発現は容易ではない。反対に大腸菌は比較的柔軟な発現制御機構のため、異種遺伝子の発現に優れている。これを導入した枯草菌株を作出することが出来れば、前述の問題の解決策となると考えた。当研究では、遺伝子発現の中でも転写の段階に焦点を当て枯草菌の転写制御機構を解明し、最終的に枯草菌における異種遺伝子発現の最適化を目指す。また、RNA ポリメラーゼ（RNAP）は、シグマ因子によるプロモーター配列認識（-10 と-35）に依存した開始機構が存在することがよく知られているが、目的生物のシグマ因子を導入するだけではその生物のプロモーターを動かすことは出来ない。そこで、大腸菌の β’サブユニットにはプロモーターの+1～-10（以下、ディスクリミネーター配列）に結合する領域があるという知見[1]があり、RNAP のコア酵素にもプロモーター認識機構があることが示唆された。
【結果】大腸菌と枯草菌のディスクリミネーター配列の塩基配列を比較したところ、枯草菌ではアデニンの割合が多いことが判明した。そこで、大腸菌のみで発現する *lacUV*5 Promotor を指標にして実験を行った。このプロモーターのディスクリミネーター配列はグアニンリッチなのだが、これをアデニンリッチに換えたところプロモーターの活性がわずかながら上昇した。しかし、大規模な異種遺伝子導入を行うにあたり、すべてのプロモーターにこれを行うのは困難である。そこで、RNAP 自体を改変し大腸菌プロモーターを発現させることにした。枯草菌において、枯草菌と大腸菌の β’サブユニットを比較し、大腸菌のディスクリミネーター結合領域と相同性の認められた配列を大腸菌のものと置換し､その RNAP によって大腸菌でのみ発現するプロモーターが転写されるかどうか試みたが、活性の上昇はみられなかった。よって、ディスクリミネーター配列は、転写活性に重要な役割を持つが、その結合部位のみを変えても活性に影響しないことが分かった。
【考察】ディスクリミネーター配列を改変してプロモーター活性が上昇することはわかったが、ディスクリミネーター配列を認識する領域を改変しても活性は上昇しなかった。そのため、枯草菌のコア酵素のドメインを大腸菌のものに互換したり、変異を誘導しプロモーター活性のあるコア酵素をスクリーニングしたりして枯草菌内で大腸菌のプロモーター活性を上昇させていく。

1) Brodolin K, Mustaev A, Severinov K, Nikiforov V. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 3661-3666

Discriminator sequence, RNA polymerase, Bacillus subtilis

講演番号：2A06p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A06 会場

枯草菌でのラムノースで誘導される遺伝子発現系の構築
Engineering of a rhamnose-inducible gene expression system in *Bacillus subtilis*

○玉野 彩香、広岡 和丈（福山大生命工・生物工）
○Ayaka TAMANO, Kazukake HIROOKA (Fukuyama Univ.)

【目的】グラム陽性土壌細菌である枯草菌は植物根圏にも普遍的に見出され、種々の植物由来有機化合物を分解して炭素源として利用できる。これまでの我々の研究で、枯草菌のラムノース異化オペロン（*rhaEWRBMA*）を見出し、この発現がオペロンにコードされる RhaR 転写因子を介してラムノースによって特異的に誘導され、また CcpA によるカタボライト抑制を受けることを明らかにした [1)]。大腸菌ではラムノース異化オペロンを利用してラムノースで誘導される遺伝子発現系が構築されているが、大腸菌でのラムノース異化制御系は枯草菌のものとは異なるため、この発現誘導系は枯草菌を宿主として用いることはできない。本研究では、物質生産の観点から有用な枯草菌を宿主として、枯草菌のラムノース異化オペロンのプロモーター領域（P*rhaEW*）を利用して、ラムノースを誘導物質とした遺伝子発現系の構築を試みた。その中で、遺伝子発現量をより増大させるために、ラムノース誘導型プロモーターである P*rhaEW* の上流に、恒常的に発現をすることが知られている *cdd* 遺伝子のプロモーター領域（P*cdd*）、または定常期に高発現することが報告されている *ylbP* 遺伝子のプロモーター領域（P*ylbP*）を連結し、これらのハイブリッド型発現誘導系の評価を行なった。
【方法・結果】P*cdd* と P*ylbP* をそれぞれ改変型 GFP（EGFP）遺伝子（*egfp*）と連結し、染色体に導入した枯草菌株を作製した。各枯草菌株を蛍光顕微鏡観察し、また発せられる蛍光強度を定量した結果、P*ylbP* での EGFP 発現の方が高いことがわかった。次に、RhaR 結合領域を含む P*rhaEW* を、P*cdd* または P*ylbP* と *egfp* との間に挿入し、これらの構築を保持した菌株を作製した。構築を行う際、P*cdd* と P*ylbP* の各プロモーター配列と SD 配列の間に BamHI サイトを導入したところ、EGFP 発現の若干の低下が見られた。作製した一連の菌株をグルコースまたはラムノースを炭素源とした培地を用いて培養した結果、幾つかの菌株でラムノースによる EGFP 発現の誘導が確認された。ラムノースを炭素源として対数増殖期後期まで培養したときと定常期後期まで培養したときのいずれの条件でも、P*ylbP* に P*rhaEW* を挿入した構築をもつ菌株での EGFP 発現が最も高かった。また、SD 配列を *ylbP* から *rhaEW* のものに置換すると EGFP 発現が低下することから、*ylbP* の SD 配列の方が翻訳効率が高いことが示唆された。さらに、P*rhaEW* の上流に配置した P*cdd* と P*ylbP* が EGFP 発現パターンに影響を及ぼすことも確認された。

1) Hirooka, K., Kodoi, Y., Satomura, T., and Fujita, Y. 2016. J. Bacteriol. **198:**830-845.

Bacillus subtilis, rhamnose, gene expression

発表責任者：広岡和丈（hirooka@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2A06p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A06 会場

枯草菌 RNA ポリメラーゼ α サブユニット遺伝子 *rpoA* の発現制御機構の解析

Analysis of expression of *rpoA* encoding α subunit of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*

○朝井 計[1]、林田 莉奈[2]、白川 文教[2] ([1]東京農大・バイオ、[2]埼玉大・理工)
○Kei ASAI[1], Marina HAYASHIDA[2], Fuminori SHIRAKAWA[2] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Saitama Univ.)

細菌のリボゾームタンパク質をコードする遺伝子は複数がクラスターとなり、いくつかのオペロンを形成している。グラム陰性のモデル細菌大腸菌を用いた研究から、リボゾーム量が細胞内に過剰となると、オペロン内の１つのリボゾームタンパク質によって、オペロン全体の発現が、抑制されることで、自己制御されていることが知られているが、これらの機構が他の真正細菌でも共通に用いられているかは不明である。例えば大腸菌では、S4 タンパク質が RNA ポリメラーゼ α サブユニットをコードする *rpoA* 遺伝子を含むオペロンの発現を制御しているが、グラム陽性のモデル細菌、胞子形成土壌細菌である枯草菌では、同様の *rpoA* 遺伝子を含むオペロンには S4 をコードする遺伝子は含まれておらず、従ってこのオペロンがどのように制御されているのか分かっていない。このように RNA ポリメラーゼのコアサブユニットをコードする遺伝子はリボゾームタンパク質オペロン内に含まれているが、その意義や発現制御に関しても不明な点が多い。枯草菌 *rpoA* 遺伝子の上流域にはプロモーターは無く、大腸菌の *rpoA* 上流には無い、約 200bp のステムループ構造をとりうる非翻訳領域が存在した。そこで、この非翻訳領域が、*rpoA* やそのオペロンの制御に関与する可能性を考え、解析を行った。

rpoA 上流の非翻訳領域を *rpoA* 構造遺伝子と分断するように、オペロン構造を破壊すると、LB 培地で増殖遅延が生じた。また、オペロン構造を維持し、非翻訳領域を欠失させても、同様の増殖遅延が引き起こされた。これらの増殖遅延は *rpoA* を部分２倍化して発現することで解消された。また、*rpoA* の上流域と LacZ の転写融合または翻訳融合を用いたレポーターアッセイによる発現解析により非翻訳領域が *rpoA* の発現に関与しているか、解析を行った。これらの結果、この非翻訳領域は主に RpoA の転写後段階での発現制御に関わることが示唆された。また、非翻訳領域の欠失株は、最少培地では増殖阻害を引き起こしたが、この増殖阻害も *rpoA* の部分２倍化による過剰発現で抑圧された。さらにこの増殖阻害はカザミノ酸添加でも解消されたことから、欠失株はアミノ酸要求性となっていることがわかった。これらのことから、アミノ酸の不足に応じて、非翻訳領域は *rpoA* の発現を翻訳段階で制御していることが示唆された。

Bacillus subtilis, RNA polymerase, *rpoA*

講演番号：2A06p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A06 会場

酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子発現におけるアミノ酸パーミアーゼの機能解析

Functional analysis of amino acid permeases in the expression of D-aspartate oxidase gene in yeast

○今西 大生、高橋 祥司、阿部 勝正、解良 芳夫（長岡技科大・生物）
○Daiki IMANISHI, Shouji TAKAHASHI, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】D-アスパラギン酸オキシダーゼ（DDO）は，酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD を補酵素とするフラビン酵素である．真菌において，DDO は酸性 D-アミノ酸を生育に利用する役割や酸性 D-アミノ酸の毒性を低減させる役割を担っていることが明らかにされている．我々は，DDO を多量に生産する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株を土壌から単離し，その DDO(ChDDO)の酵素学的諸特性や生理機能について解析を進めてきた．本酵素は，酸性 D-アミノ酸のなかでも D-Asp に対して高い特異性および触媒活性を示し，培養液中の D-Asp の存在により特異的に誘導発現され，L-Asp の共存により誘導発現が抑えられることが示されている．同属酵母 *Cryptococcus neoformans* ではアミノ酸パーミアーゼ Aap4 および Aap5 が L-Asp の取り込みに関与していることが示唆されていることから，UJ1 株における *ChDDO* 遺伝子の誘導発現に，これら Aap を介した D-Asp の取り込みが関与している可能性が考えられた．そこで本研究では，*C. humicola* UJ1 株における *AAP4* 遺伝子や *AAP5* 遺伝子の機能解析や遺伝子破壊を通して，D-Asp による *ChDDO* 遺伝子誘導発現とこれら Aap の関係を明らかにすることを目的とした．

【方法・結果】*C. humicola* UJ1 株について Illumina Hiseq 2500 を用いてドラフトゲノムを解析したところ，ゲノムサイズは 22,628,423 bp であり GC 含量は 62.8%と推定された．MiGAP によりアノテーションしたところ，12,694 個の CDS の存在が推定された．得られたドラフトゲノム配列中には *ChDDO* 遺伝子の他に，D-アミノ酸オキシダーゼや D-セリンデヒドラターゼなど D-アミノ酸代謝に関係する酵素の遺伝子の存在が確認された．*C. humicola* UJ1 株における *AAP* 相同遺伝子を探索したところ，*C. neoformans* に存在する 8 つの *AAP* 遺伝子(*AAP1*～*AAP8*)の全てを UJ1 株に見いだすことができた．L-Asp の取り込みに関与すると考えられる UJ1 株の Aap4 および Aap5 はそれぞれ 805 および 562 アミノ酸残基から構成されており，*C. neoformans* の Aap4 と Aap5 とそれぞれ 49.4%と 59.6%のアミノ酸配列同一性を有していた．UJ1 株のこれら Aap のアミノ酸配列には，既知の Aap と同様に，9～12 個のα-ヘリックスで構成される膜貫通領域 SLC12A ドメインが見いだされた．*C. humicola* における Aap4, Aap5 と D-Asp による *ChDDO* 遺伝子誘導発現との関係を明らかにするため，UJ1 株のウラシル栄養要求性変異株である UM3 株を用いて *AAP4* 遺伝子と *AAP5* 遺伝子破壊株を作製した．現在は，これら遺伝子破壊株における *ChDDO* 遺伝子発現への影響を解析している．

D-aspartate oxidase, *Cryptococcus humicola* UJ1, amino acid permease

発表責任者：高橋 祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2A06p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A06 会場

ビフィズス菌由来 ATPase MsiK は ABC トランスポーターを介した糖質取込みをグローバルに制御する
Sugar transport system in *Bifidobacterium longum* 105-A
○前田 信悟[1]、阪中 幹祥[1]、後藤 愛那[2]、村上 隆太[2]、加藤 紀彦[2]、杉山 友太[1]、谷内 寛之[1]、栗原 新[1]、玉置 尚徳[3]、吹谷 智[4]、横田 篤[4]、片山 高嶺[1,2] ([1]石川県大生資環、[2]京大院生命、[3]鹿大農、[4]北大院農)
○Shingo MAEDA[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Aina GOTOH[2], Ryuta MURAKAMI[2], Toshihiko KATOH[2], Yuta SUGIYAMA[1], Hiroyuki YACHI[1], Shin KURIHARA[1], Hisanori TAMAKI[3], Satoru FUKIYA[4], Atsushi YOKOTA[4], Takane KATAYAMA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kagoshima Univ., [4]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】
腸内細菌であるビフィズス菌は様々な糖質に対する代謝能を有することが知られており、この特徴は、本菌が糖質取込み遺伝子（特に、ABC トランスポーター関連遺伝子）を多数持つことに起因していると考えられている。一般に、糖質取込みを担う ABC トランスポーターは、基質結合タンパク質、膜貫通タンパク質およびエネルギー供給を担う ATPase で構成されており、それらの遺伝子群は一つのクラスターとしてゲノム上に保存されている。しかしながら、ビフィズス菌のゲノム上に存在する当該遺伝子クラスターには ATPase 遺伝子が存在しないことが多い。その代わりとして、各遺伝子クラスターとは全く別のゲノム領域に *Streptomyces* 属で複数の糖質トランスポーターに関与することが知られている ATPase 遺伝子（以降 *msiK*）のホモログが存在する。本研究ではビフィズス菌の MsiK について機能を明らかにすることで、ビフィズス菌の糖質代謝機構への理解を深めることを目指した。
【方法・結果】
Bifidobacterium longum subsp. *longum* (*B. longum*) 105-A 株由来の精製 MsiK-$(His)_6$ の ATPase 活性を確認すると共に、*B. longum* 105-A 株の *msiK* 欠損株と *msiK* 相補株を作出し、それらの株と親株の生育試験を 21 種類の糖質をそれぞれ炭素源として行った。単糖（計 7 種類）を炭素源とした場合には株間での生育に差が見られなかったが、二糖以上の糖質（計 14 種類）では *msiK* 欠損株において生育遅延もしくは生育欠損が観察された。これらの結果から MsiK は二糖以上の糖質代謝に寄与するグローバル ATPase であることが示された。
B. longum 105-A 株における *msiK* および各 ABC トランスポーター遺伝子群（基質結合タンパク質遺伝子）の発現様式を qRT-PCR により解析したところ、*msiK* の発現は様々な二糖以上の糖質によって、また各 ABC トランスポーター遺伝子群は対応する糖質によって上昇することが明らかとなった。更に、*msiK* の発現上昇はグルコース（非誘導基質）が同時に存在する場合には抑制されることが示された。これらの結果から、*B. longum* 105-A 株は *msiK* の遺伝子発現を調節することで糖質取込みをグローバルに制御していることが明らかとなった。*msiK* は全てのビフィズス菌に保存されていることから、今回得られた研究成果は、*B. longum* 105-A 株だけでなく様々なビフィズス菌種／株における幅広い糖質代謝機構を理解するうえで非常に重要な知見となると考えられる。

Transporter, Sugar, *Bifidobacterium*

発表責任者：阪中幹祥（sakanaka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A06p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A06 会場

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* における Hap 複合体構成因子の役割の違い
Individual roles of Hap complex components in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*
○小田 沙織[1]、由里本 博也[2]、阪井 康能[2] ([1]鳥取大工、[2]京大院農)
○Saori ODA[1], Hiroya YURIMOTO[2], Yasuyoshi SAKAI[2] ([1]Tottori Univ., [2]Kyoto Univ.)

メタノール資化性酵母は強力なメタノール誘導性プロモーターを持ち、異種遺伝子発現系宿主として基礎研究および産業界で広く利用されている。しかしメタノール誘導性遺伝子発現を制御する分子機構については、関連する転写調節因子の探索や機能解析が進められているものの、全容の解明には至っていない。我々はこれまでに *Candida boidinii*、*Pichia pastoris* という二種類のメタノール資化性酵母を用いて、転写因子 Hap 複合体の機能解析を行ってきた。Hap 複合体は 3 つの DNA 結合因子 Hap2、Hap3、Hap5 で構成される、真核生物に広く存在する転写因子である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてはグルコース枯渇時に呼吸代謝関連遺伝子の転写を活性化し、diauxic shift を促進することが知られている。また生物間での保存性が高く、*S. cerevisiae* とヒトの Hap 複合体構成因子に互換性があることが報告されている。

我々はこれまでに、メタノール資化性酵母 *C. boidinii* の Hap 複合体がコア領域において ScHap 複合体と高い相同性を示すにも関わらず、メタノール誘導性遺伝子の転写を特異的に活性化することを明らかにした。さらに複合体構成因子の一つ CbHap3 の C 末端側、約 40 a.a.の領域がメタノール資化性酵母間でのみ高度に保存され、これが転写活性化に寄与することを見出した(Oda et al., Microbiology 2016)。そこで、メタノール誘導性遺伝子発現を制御する分子機構が他の酵母においても共通であると考え、工業的に繁用されているメタノール資化性酵母 *P. pastoris* における Hap 複合体の解析を行った。*P. pastoris* で見出された 2 つの *HAP3* ホモログ遺伝子 *PpHAP3-1*、*PpHAP3-2* については、前者は CbHap3 で見出された C 末端保存領域を持ち、メタノール誘導性遺伝子発現に必要である一方、後者は C 末端保存領域を持たず、遺伝子破壊株のメタノールでの生育が野生株と同等であったことから、メタノール誘導との関連は見られなかった。また、*PpHAP2* および *PpHAP5* 遺伝子の欠損により、メタノールのみならずグルコースやグリセロールを炭素源とする培地、さらに特定のアミノ酸を窒素源とする培地でも生育の低下が見られた。以上の結果から、3 つの構成因子すべてがメタノール誘導を特異的に制御する CbHap 複合体と異なり、PpHap 複合体は各構成因子が異なる役割を持ち、メタノール誘導だけでなく、より多岐に渡る生理機能をもつことが示唆された。

methylotrophic yeast, transcription factor, Hap complex

発表責任者：小田　沙織（s.oda@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A06p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A06 会場

酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来転写因子 Lrp の機能解析
Functional study on leucine-responsive regulator from an acetic bacterium *Komagataeibacter europaeus*

○石井 友理[1]、トリヌグラハ アフィ チャンドラ[1]、赤坂 直紀[2]、東久保 遥[1]、繁 宥樹[1]、佐古田 久雄[2]、秀瀬 涼太[1]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大理工、[2]マルカン酢(株))
○Yuri Ishii[1], Afi Candra Trinugraha[1], Naoki Akasaka[2], Haruka Higashikubo[1], Yuki Shige[1], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd.)

【目的】酢酸菌は、エタノールを酸化して酢酸を生産する能力に優れており、食酢の製造に利用されている。エタノール酸化により生じた酢酸は、外環境(細胞外)の pH 低下を招く。これまでに、酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は、細胞外 pH の低下に伴い、細胞内 pH が対数期から定常期初期にかけて 5 まで低下することを示した(1)。細胞内 pH の変動は転写因子の標的 DNA に対する親和性にも影響を与えると考えられる。*K. europaeus* 由来の転写制御因子 Lrp(leucine-responsive regulatory protein: *Ke*Lrp)は、メチオニン代謝やポリアミンの恒常性維持に関与するが(2)、その標的遺伝子や制御機構は不明である。本研究では、*Ke*Lrp により制御される標的遺伝子を探索し、被制御遺伝子に対する pH の影響を明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】大腸菌では Lrp 標的遺伝子のうち、分岐鎖アミノ酸生合成の律速酵素をコードする遺伝子(*ilvIH*)において、その結合配列が明らかとなっている(3)。*K. europaeus* 野生株および *Kelrp* 完全欠損株の mRNA を供試した mRNA-seq 法により、*Ke*Lrp により発現制御を受ける遺伝子群を探索した。この結果、分岐鎖アミノ酸生合成遺伝子に加え、酸化還元反応、グルコースの取り込み系、中枢代謝、および呼吸鎖に関わる遺伝子群が完全欠損株で発現変動がみられた。また、これら遺伝子の推定プロモーター領域近傍には、大腸菌 Lrp と類似した結合配列が複数箇所認められた。次に、培地中のグルコース濃度を野生株および完全欠損株間で比較したところ、野生株ではグルコースを定常期以降に消費するのに対し、完全欠損株では対数期から徐々に消費していることがわかった。本菌は炭素源として、エタノール、酢酸、グルコン酸(グルコース由来の有機酸)の順に優先的に利用している。また、膜結合型アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、野生株と比べて完全欠損株で有意に活性の減少が見られていた(4)。これらの結果から、完全欠損株におけるグルコース消費の早期化は、呼吸鎖の停滞により酢酸産生量が低下したことに起因すると考察できる。次に、*Ke*Lrp を、大腸菌を宿主に高発現し精製し、pH 変化に伴う構造変化を円偏光二色性により検討した。本発表では大腸菌の Lrp と比較した結果についても合わせて報告する。
【引用文献】(1) 繁ら, 第 69 回 日本生物工学会大会, (2017). (2) Ishii, Y. et al., J. Biosci. Bioeng., in press, (2017). (3) Marasco, R. et al., J. Bacteriol., 176, 5197-201, (1994). (4) 石井ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017).

acetic acid bacteria, leucine-responsive regulatory protein, transcriptome

講演番号：2A06p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A06 会場

Shewanella oneidensis における D-乳酸代謝系の制御機構と生理機能の解析
Regulation and physiological functions of D-lactate metabolism in *Shewanella oneidensis*.
○笠井 拓哉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Takuya Kasai, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe (Tokyo Univ. Parm. Life Sci.)

【背景と目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は金属還元細菌であり、多様な呼吸能力を持つことが知られている。MR-1 株は呼吸を行う際に、電子受容体として酸素やフマル酸、硝酸のような可溶性物質だけでなく、金属酸化物等の菌体外に存在する固体物質を利用して呼吸を行うことが可能である。これまでの研究から、MR-1 株の嫌気呼吸系の発現は主に cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) によって制御されることが明らかになっている。一方、MR-1 株は炭素源・電子源として乳酸を好んで利用するが、乳酸代謝系の発現制御機構については不明な点が多い。乳酸の酸化を触媒する乳酸脱水素酵素 (LDH) は内膜キノンを介して呼吸鎖とつながっているため、乳酸代謝系と呼吸系は共通の機構により制御されている可能性が考えられた。そこで我々は MR-1 株の乳酸代謝系が嫌気呼吸系と同様に CRP によって制御されていると予想し、本研究ではこの仮説について検証した。

【結果と考察】MR-1 株の CRP 欠損株 (Δ*crp*) を作製し、DL-乳酸を唯一の炭素源とした最少培地で培養した結果、Δ*crp* の最終菌体密度は野生株 (WT) の約半分までしか到達しなかった。培養後の培地中の乳酸濃度を測定した結果、Δ*crp* は D-乳酸をほとんど資化していないことが明らかとなった。この結果から、CRP が D-乳酸代謝系の制御に関与することが示唆された。MR-1 株は Dld と LdhA の 2 種類の D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) を有しており、Dld は D-乳酸をピルビン酸へ酸化するキノン依存的 D-LDH、LdhA は NADH を使用してピルビン酸を D-乳酸へ還元する NADH 依存的 D-LDH として機能する。Δ*crp* 株における *dld* と *ldhA* の発現量を解析した結果、Δ*crp* ではこれらの遺伝子の発現量が低下していることが示された。また精製 CRP タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより、これらの D-LDH 遺伝子の上流に CRP が結合することが示された。以上の結果から、MR-1 株の D-乳酸代謝系は嫌気呼吸系と同様、CRP による発現制御を受けていることが示された。

LdhA は嫌気条件下での糖代謝に関与すると考えられたため、MR-1 株が利用可能な糖である *N*-アセチルグルコサミン (NAG) を基質として電子受容体制限条件下で LdhA 欠損株（Δ*ldhA*）を培養し、本酵素の嫌気的な NAG 代謝への寄与を調べた。その結果、Δ*ldhA* の増殖速度は WT よりも低下しており、LdhA が NAG 代謝に寄与していることが示された。興味深いことに、同様の生育遅延は Dld 欠損株 (Δ*dld*) を NAG で培養した際にも見られた。したがって、LdhA と Dld から構成される MR-1 株の D-乳酸代謝系は解糖系で産生された還元力 (NADH) を内膜キノンに伝達するための電子伝達系の一部として機能し、これにより速やかな糖代謝に寄与している可能性が示唆された。

Shewanella, cyclic AMP receptor protein, D-lactate metabolism

講演番号：2A06p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A06 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 における LOV-HK の機能解析
Functional analysis of LOV-HK in *Roseobacter denitrificans* OCh114
○山本 麻衣子、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Maiko YAMAMOTO, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】*Roseobacter denitrificans* OCh114 株は紅色非硫黄細菌の一種で、好気条件で酸素非発生型光合成を行う。近年、好気性光合成細菌は海洋表層微生物の最優占種であることが明らかとなり、地球規模の物質循環において重要な役割を果たしていることが示唆されている。好気性光合成細菌の環境中での優占化には、光合成や好気呼吸、脱窒などの多様なエネルギー代謝系を様々な環境の変化に応じて使い分けていることが重要であると考えられる。その中でも、光合成関連遺伝子の発現条件は、同じ紅色光合成細菌であり嫌気条件で光合成を行う嫌気性光合成細菌とは大きく異なるが、その制御機構は分かっていない。LOV（Light, Oxygen, Voltage）ドメインとヒスチジンキナーゼからなる LOV-HK をコードする遺伝子は好気性光合成細菌のゲノム上に比較的良く保存されており、過去の研究より、OCh114 株で *LOV-HK* を破壊すると光合成関連遺伝子の発現が低下した。このことから、LOV-HK が光合成関連遺伝子の発現制御に関わっていることは明らかとなったが、詳細な発現制御機構は不明である。そこで本研究では、好気性光合成細菌の光合成制御機構の解明のため、OCh114 株における LOV-HK の機能解析を行った。
【方法・結果】一般的に、LOV-HK は二成分制御系のセンサーキナーゼとして機能し、LOV ドメインで光を感知し、それにより自己リン酸化活性が上昇し、シグナル伝達をすることが知られている。そこで、本菌の LOV-HK が光に応答するのを明らかにするため、LOV-HK を異種発現・精製し、発色団の分析及び光による吸収スペクトルの変化を解析した。LOV ドメインには発色団としてフラビンが結合し、フラビンによって光が吸収されると LOV ドメインのシステイン残基とフラビンとの間に一過的に共有結合が形成される。大腸菌で異種発現・精製した LOV-HK の吸収スペクトルを測定したところ、300-400 nm に吸収がみられ、フラビンが結合していることが示唆された。精製した LOV-HK よりフラビンを抽出し TLC により解析を行ったところ、フラビンモノヌクレオチド（FMN）が検出された。さらに、LOV-HK の光による吸収スペクトルの変化を測定したところ、暗状態では 450 nm と 370 nm 付近に幅広い吸収がみられ、白色光の照射により 450 nm 付近の吸収がなくなり、390 nm 付近に幅広い吸収が現れた。この変化は FMN がシステインと結合を形成したときにみられる特徴と一致し、また、白色光照射後に暗所におくと約 2 時間でその吸収スペクトルは暗状態へと戻った。以上のことから、OCh114 株の LOV-HK も光応答性を示すヒスチジンキナーゼであることが示唆された。現在、LOV-HK の自己リン酸化活性について解析中である。

aerobic phototrophic bacteria, LOV-HK, two-component system

講演番号：2A06p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A06 会場

Comamonas testosteroni TA441 の末端酸化酵素の発現制御
Regulation of the terminal oxidase genes of *Comamonas testosteroni* TA441
○新井 凌、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Ryo ARAI, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【目的】
Comamonas testosteroni はグラム陰性の土壌細菌であり、フェノールをはじめとした多くの芳香族化合物を資化する能力を持つ菌株が知られている。*C. testosteroni* TA441 株のドラフトゲノム配列から、本菌は好気呼吸の末端酸化酵素を 4 種（*cbb*$_3$-type、*aa*$_3$-type、*bd*-type、*bo*$_3$-type）持っていると推測された。一般的に、*aa*$_3$-type は高酸素条件で、*cbb*$_3$-type は低酸素条件で、*bd*-type はシアン化物イオン存在下で発現が上昇することが知られているが、本菌では未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではこれらの 4 種の末端酸化酵素を環境に応じてどのように使い分けているかを解明することを目的とした。

【方法・結果】
各末端酸化酵素遺伝子の発現制御を調べるために、栄養条件、酸素条件を変えて生育させた菌体を用いた定量 RT-PCR を行った。本実験では、LB 培地とフェノール等を炭素源とした培地、対数期の菌体と定常期の菌体、高酸素条件（20% O_2）と低酸素条件（2% O_2）の培養条件で比較した。
本菌では高酸素条件でも酸素親和性の高い *bd*-type と *cbb*$_3$-type をメインで使っているという特徴があることが判明した。また、フェノールを炭素源とした条件では *cbb*$_3$-type の発現量低下と *aa*$_3$-type の上昇が見られ、炭素源による末端酸化酵素の使い分けがあることが分かった。低酸素条件（2% O_2 では *cbb*$_3$-type の若干の上昇が見られた。

Comamonas testosteroni, terminal oxidase, aerobic respiration

講演番号：2A06p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A06 会場

Burkholderia multivorans の鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群における転写制御因子 IscR の解析

Analysis of Transcriptional regulator of genes involved in iron-sulfur cluster biosynthesis machinery in *Burkholderia multivorans*

○野々山 翔太、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大院生命科）
○Shouta NONOYAMA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだタンパク質は代謝や遺伝子の発現制御等、生命活動の根幹を担っている。主に大腸菌を用いた解析により、鉄硫黄クラスターを合成する機構に複数のタンパク質が関与し、これらをコードする遺伝子はオペロンを形成していることが明らかとなっている。本研究に用いた *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌であり、鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)を一つのみ有している。これまでの解析から、*isc* オペロンは本株の生育に必須であること、加えて *isc* オペロンの先頭には発現制御を担っている *iscR* と推定される遺伝子が存在し、IscR 結合配列も存在していることが明らかとなっている。そして、実際に解析を行い、IscR が本遺伝子群の上流領域に存在するプロモーター領域周辺に特異的に結合する転写抑制因子であることが強く示唆されていた。しかし、IscR が何を認識して *isc* オペロンの転写を調節しているかは不明である。そこで本研究では ATCC 17616 株における鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群の発現機構解明を目的とし、IscR に着目した解析を行った。

ATCC 17616 株 IscR のアミノ酸配列を他細菌株 IscR ホモログタンパク質のアミノ酸配列と比較した結果、IscR には鉄硫黄クラスターとの配位結合に関わると推定される 3 つのシステイン残基が保存されており、ATCC 17616 株の IscR は鉄硫黄クラスターと結合する可能性が示唆された。そこで、IscR に存在する 3 つのシステイン残基をアラニンに置換した IscR-3CA を用いた解析を行った。

まず、大腸菌を用いた系によって発現・精製した IscR-3CA と蛍光ラベルした *isc* オペロン上流配列を用いて、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、IscR-3CA は *isc* オペロン上流領域に特異的に結合することが明らかとなり、鉄硫黄クラスターと結合していない IscR でも *isc* オペロンの上流に結合する可能性が示唆された。また、結合する DNA 領域を同定するためにフットプリント解析を行なった結果、野生型の IscR と IscR-3CA の結合配列はほぼ同じであった。次に、ATCC 17616 株の IscR-3CA 高発現株を作製し、定量 RT-PCR によって *isc* オペロンの転写解析を行ったところ、IscR-3CA は *isc* オペロンの転写を抑制できなかった。これまでの解析及び以上の結果から、IscR は *isc* オペロンのプロモーター近傍と相互作用し、鉄硫黄クラスターを認識することで *isc* オペロンの転写を抑制していることが強く示唆された。しかし、鉄硫黄クラスターを保持していない IscR がどのような役割を担っているか不明であるため、現在、この点に関する解析を進めている。

iron-sulfur cluster, Transcriptional regulation

講演番号：2A06p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A06 会場

PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株のカタボライト調節に関わる二成分調節系因子 BphPQ の解析
Functional analysis of BphPQ protein involved in the catabololite control in a PCB-degrader *Acidovorax* sp. KKS102.
○佐々木 春菜、永田 裕二、津田 雅孝、大坪 嘉行（東北大）
○Haruna SASAKI, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

βプロテオバクテリアに属する *Acidovorax* sp. KKS102 株は人為起源の難分解性化合物であるポリ塩化ビフェニル(PCB)の分解細菌である．複数の分解酵素遺伝子をコードする *bph* オペロンは pE プロモーターより転写される．pE の活性は，コハク酸などより好ましい炭素源が存在するときに転写が抑制される機構，すなわちカタボライト調節機構の支配下にある。これまで，本株のカタボライト調節機構について，コハク酸などが抑制炭素源となること，また BphPQ よりなる二成分調節系(BphP がセンサーカイネース，BphQ がレスポンスレギュレーター)が関与することが明らかとなっていたが，BphPQ がどのように抑制炭素源の存在を感知し，pE 活性に反映させるのかについては未知のままである．本研究ではこの調節機構についての分子メカニズム解明を研究目的としている．
BphP のアミノ酸配列の解析より、BphP の自己リン酸化および BphQ リン酸化に関わるドメインは C 末端側に存在することが示唆された。BphP のこれらドメインを含む C 末端部分(BphPc と呼ぶ)を大腸菌で発現させたところ、pE が BphQ 依存的に強く活性化されることが見いだされた。また精製 BphPc を[γ-^{32}P] ATP とインキュベーションするとリン酸化されること、このリン酸基が BphQ に転移することを見いだした。近年、タンパク質のアセチル化が、原核生物においても重要な役割を果たしていることが報告されるようになってきている。精製 BphQ をアセチルリン酸あるいはアセチル CoA とインキュベーションすると、抗アセチルリジン抗体により認識されるようになることがウエスタンブロット解析により明らかとなった。また BphQ をアセチルリン酸とインキュベーションした後にトリプシン消化して質量分析を行ったところ、BphQ の 108 番目のリジン残基がアセチル化されていると考えて矛盾しないフラグメントが観察された。
以上、通常の二成分調節系と同様、BphP が BphQ をリン酸化し、リン酸化 BphQ がプロモーターを活性化すること、また抑制炭素源存在下でアセチル CoA あるいはアセチルリン酸の濃度が上昇して、BphQ がアセチル化し、BphQ のリン酸基受容あるいはプロモーター活性化能に影響を与えることがカタボライト調節機構の本質であると推測している。
現在 BphQ のリン酸化およびアセチル化が BphQ の転写活性可能にどのような影響を与えるかについて、大腸菌の RNA polymerase を用いた in vitro transcription により解析を行っている。なお、転写産物を検出する方法として、転写産物に対して蛍光ラベルされた primer を用いて逆転写を行い、キャピラリーシーケンサーにより逆転写産物を検出する実験系を構築し、これを用いて解析を行っている。

catabolite coontrol, two-component regulatory system, PCB-degrader

発表責任者：佐々木春菜（h.sasaki@pop.ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A06p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A06 会場

pCAR1 由来カルバゾール分解系遺伝子群の発現は一細胞レベルでばらついているか？
Single-cell analysis of expression pattern of carbazole degradative genes on pCAR1
○山本 夏実、高比良 早紀、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Natsumi YAMAMOTO, Saki TAKAHIRA, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】プラスミドは難分解性物質分解能等の新規形質を宿主に付与するが、新規に獲得した遺伝子の発現は宿主ごとに異なる。これは宿主染色体由来の因子がプラスミド上の遺伝子の転写に影響するためであると考えられる。更に、クローン集団中で同一遺伝子の発現が一細胞ごとに異なる例が報告されたことから、宿主の違いの他、細胞ごとの発現の揺らぎが集団としての分解力を特徴付ける可能性が考えられる。本研究では *Pseudomonas* 属細菌を宿主として pCAR1 上のカルバゾール分解系遺伝子群の発現を一細胞レベルで解析し、宿主ごとに比較することを目的とした。カルバゾール分解系遺伝子群は、カルバゾールを代謝する *car* オペロン、中間代謝産物であるアントラニル酸を代謝する *ant* オペロン、転写制御因子をコードする *antR* から成る。昨年度本大会において *ant*、*car* 両オペロンの転写を誘導する P_{ant} の解析系を構築したことを報告した。今年度は P_{ant} に加え *car* オペロンの転写を誘導する P_{carAa}、*antR* の転写を誘導する P_{antR} の 3 プロモーターに着目し解析を試みた。
【方法・結果】プロモーターの下流に *gfp* が結合した遺伝子カセットを mini-Tn*7*T を用いて *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1) 株、*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1(pCAR1) 株、及び pCAR1 保持株である *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の染色体上に挿入し解析用の菌株を作製した。アントラニル酸誘導性をもつ P_{ant} については、アントラニル酸を添加したコハク酸培地で培養時の蛍光強度を経時的に測定した結果、3 株間で誘導のかかり方に差が見られた（図）。CA10 株ではばらつきが小さいのに対し、KT2440(pCAR1) 株と Pf0-1(pCAR1) 株では一部の細胞が低い蛍光を示し、P_{ant} からの発現が弱い細胞の存在が示唆された。蛍光強度の低い Pf0-1(pCAR1) 株においては、相同組み換えにより pCAR1 上の *antR* を欠失していることが示された。今後、KT2440(pCAR1) 株についても蛍光強度の低い細胞の解析を行う。P_{carAa} および P_{antR} については、転写量が小さいためか、*gfp* を用いた解析では蛍光が検出されなかった。そこで 2 つの P_{antR} プロモーター下流に、より蛍光強度の高い *sfgfp* を挿入した株を作製し解析を行ったが、蛍光は検出されなかった。発表では、現在行っている、より蛍光強度の高い蛍光タンパク質を用いた解析の結果についても報告する。

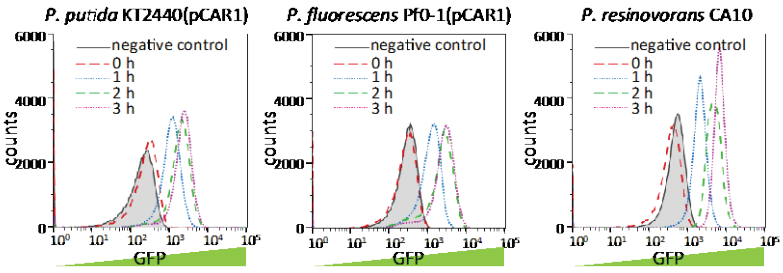


図. P_{ant} からの発現の変化
アントラニル酸を添加したコハク酸培地での P_{ant} からの発現をフローサイトメーターで測定した結果を示す。横軸は緑色蛍光強度を、縦軸は検出された分子数を示す。

Pseudomonas, single-cell, plasmid

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A06 会場

乳酸菌環境単離株における細胞表層多糖合成遺伝子の相変異機構の解析
The phase variation of capsular polysaccharide synthesis gene in *Lactobacillus plantarum* environmental isolates

○江橋 由夏[1]、河嶋 伊都子[1]、尾花 望[2]、久保田 浩美[3]、清川 達則[1]、八城 勢造[3]、永井 智[3]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大院・生命環境科学、[2]筑波大・生命環境、[3]花王・安全性科学研)
○ Yuka EHASHI[1], Itsuko KAWASHIMA[1], Nozomu OBANA[2], Hiromi KUBOTA[3], Tatsunori KIYOKAWA[1], Seizo YASHIRO[3], Satoshi NAGAI[3], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Univ. of Tsukuba graduate school, [2]Univ. of Tsukuba, [3]Kao Corp.)

乳酸菌の一種 *Lactobacillus plantarum* は、発酵食品やプロバイオティクスとして身近に利用されている一方、高いストレス耐性能を有することから食品に混入・残存し食品変敗を引き起こす被害報告も多くなされている。さらに本菌はバイオフィルムと呼ばれる集団を形成することで様々なストレスへの耐性が上昇することから、バイオフィルム状態における耐性獲得機構の解明とその制御法の開発が望まれている。

先行研究において、実環境中から単離した *L. plantarum* の集団中では、2 種類のコロニー形態（Compact colony: Cc、Mucoid colony: Mc）が存在し、両者はリバーシブルに出現することが新規に明らかとなった。また Cc と Mc をそれぞれ単離し形成させたバイオフィルムでは、その構造やストレスに対する耐性特異性が異なることが示された。これより 2 種コロニー形態の出現が実環境中で形成されるバイオフィルムの性質に大きな影響を与えると考えられる。そこで本乳酸菌のコロニー形態変化メカニズムの解明及びその生態的意義の理解を本研究の目的とした。

先行研究におけるトランスクリプトーム解析より、Cc に比べ Mc では *cps2* オペロンの発現量が上昇していることが明らかとなった。*cps2* オペロンは莢膜と呼ばれる細胞表層の多糖合成に関与する遺伝子群であり、墨汁を用いたネガティブ染色では Mc の細胞表層により厚みのある莢膜が観察された。また *cps2* オペロンに対する変異株を作製したところ、変異株からは Cc のみが出現し、また Cc 野生型に近いバイオフィルム形成が観察された。これより *cps2* オペロンの発現が Mc 出現に関与すると示された。さらに Cc と Mc における *cps2A* 上流領域の配列を比較したところ、プロモーター領域を含む一部配列に逆位が認められ、これによって *cps2* の転写が調節されていると考えられた。また継代培養で得られた Cc、Mc においても同領域に逆位が確認され、部位特異的な配列逆位による *cps2* 発現の相変異がコロニー形態の変化をもたらすことが示された。

実環境中では、乳酸菌集団内に Cc と Mc が混在したヘテロなバイオフィルムを形成している。本研究で明らかとなった *cps2* 発現の相変異を介した莢膜合成量の変化により、集団中に常に一定の割合で 2 種コロニー形態を保持していると推測される。異なる性質を有する Cc 及び Mc を集団中に共存させることで、様々なストレスの存在する実環境中での集団全滅のリスクを低減し環境適応を図っていると予想される。

lactic acid bacterium, biofilm, phase variation

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A06p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A06 会場

分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の転写に及ぼす影響

The effect of branched-chain polyamine on transcription in a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.

○家森 優佳[1]、濱川 匡史[1]、秀瀬 涼太[1]、兼崎 友[2]、貝沼（岡本） 章子[3]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大・理工、[2]静岡大・グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム解析部、[3]東京農大・応生科醸造)

○ Yuka Yamori[1], Masafumi Hamakawa[1], Ryota Hidese[1], Yu Kanesaki[2], Akiko Kainuma(Okamoto)[3], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Dept. of Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】ポリアミンとは分子内に複数のアミノ基を持つ脂肪族炭化水素の総称である。ポリアミンはあらゆる生物に存在し、細胞増殖や分化に関与することが知られている。55℃以上に生育至適温度をもつ（超）好熱菌は、スペルミジンなどの一般的な直鎖状ポリアミンに加えて、分岐鎖をもつ特殊な構造のポリアミン（分岐鎖ポリアミン）を有する。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*（生育至適温度：85℃）はスペルミジンに加えて、分岐鎖ポリアミン N^4-ビス(アミノプロピル)スペルミジンを主要なポリアミンとして持つ。*T. kodakarensis* の分岐鎖ポリアミン合成酵素遺伝子を破壊した BpsA 破壊株（DBP1 株）は、90°C 以上では野生株に比べ比増殖速度が著しく低下する。また、T7 RNA ポリメラーゼの活性化には、ポリアミンが寄与する事が知られている(1)。本研究では、分岐鎖ポリアミンが *T. kodakarensis* の RNA ポリメラーゼ（RNAP）の機能に及ぼす影響を調べた。

【方法と結果】DBP1 株を親株とし、RNAP のサブユニットである RpoL の N 末端に His-tag 配列を導入した株（DBP1-HisRpoL）を作出した。野生株（HisRpoL 株）及び DBP1-HisRpoL 株から RNAP を Ni^{2+}-キレートクロマトグラフィーを含む各種クロマトグラフィーで精製した。LC-MS 解析を行ったところ、両株由来 RNAP のサブユニット構成に違いはなかった。次に、*in vitro* 転写反応によって RNAP の転写活性を比較した。DBP1-HisRpoL 株由来の RNAP は 70℃において野生株と同程度の転写活性を示した一方で、80℃、90℃では著しく低下した。また、分岐鎖ポリアミンを転写反応系に添加することで、DBP1-HisRpoL 株由来の RNAP の転写活性は上昇した。転写活性の回復効果はスペルミジンと比較して高いことが分かった。これらの結果から、分岐鎖ポリアミンが RNAP の高温での安定化に寄与し、効率的な転写反応を行う上で重要であることが示された。一方、トランスクリプトーム解析により DBP1 株で顕著に転写量が減少した遺伝子を対象に、これら特異的遺伝子に対する分岐鎖ポリアミンの効果を *in vitro* 転写反応で検証した結果も報告する。

(1) Iwata *et al*. Bioorg Med Chem. 2000. 8(8):2185-2194.

polyamine, hyperthermophilic archaea, transcription

講演番号：2A06p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A06 会場

小分子 RNA ChiX を介した２種の mRNA の転写後調節

Post-transcriptional regulation of the two mRNAs through small RNA ChiX

山岸 拓矢[1]、堀井 恭子[1]、宗像 直輝[2]、南 晴香[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]、○鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化)
Takuya YAMAGISHI[1], Kyoko HORII[1], Naoki MUNAKATA[2], Haruka MINAMI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2], ○Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

Serratia marcescens は不溶性多糖キチンの分解能に優れた細菌として良く知られており、３種のキチナーゼ及びキチン結合タンパク質 CBP21 を生産し、これらの相乗効果によって効率的にキチンを分解し利用している。*S. marcescens* 2170 におけるキチン分解酵素群の発現には、転写調節因子 ChiR と、キチン分解産物である$(GlcNAc)_2$の取り込みが必須であり、その現象には、キチン分解産物の取り込みに関与するポリン（ChiP）や $(GlcNAc)_2$ 分解酵素（キトビアーゼ）をコードする *chiPQ-ctb* オペロンの 5′ 非翻訳領域（5′UTR）と、小分子 RNA（sRNA）である ChiX が関与していることが明らかになっている。ChiX は標的となる *chiR* 及び *chiP* mRNA の 5′ UTR と塩基対を形成し、転写後の発現制御を行っていると考えられる。これまでの結果から *chiP* mRNA の 5′UTR の発現がキチナーゼの発現に必要であるということが明らかになっている。*chiP* の非発現時には ChiX は *chiR* mRNA と塩基対を形成しているが、*chiP* mRNA が$(GlcNAc)_2$の取り込みにより発現誘導されると、ChiX はターゲットを変えて *chiP* mRNA と塩基対形成するようになり、ChiX による *chiR* の翻訳抑制が解除されると考えられた。つまり、キチナーゼの発現は ChiX を介して連動的に制御されている。今回、*chiP* 5′UTR にトランスポゾンが挿入されたキチナーゼ及びキトビアーゼ欠損株において、sRNA ChiX のターゲットである *chiP* 5′UTR 及び *chiR* 5′UTR をそれぞれプラスミド上で発現させ、*chiR* 及びキチナーゼ発現への影響を調べた。*chiP* 5′UTR の発現によって *chiR* とキチナーゼが発現したが、*chiR* 5′UTR をプラスミド上で発現させても *chiR* とキチナーゼの発現が認められず、*chiR* 5′UTR 自身も検出されなかった。しかし、*chiX* 欠損株においてプラスミド上で発現させた *chiR* 5′ UTR が検出された。よって、この現象には ChiX との塩基対形成による *chiR* 5′UTR の不安定化が関与すると示唆された。

small RNA, ChiX, Post-transcriptional regulation

発表責任者：鈴木一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A06p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A06 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株におけるリグニン由来ビフェニルの取り込み・代謝を調節する転写制御システム
Transcriptional regulation of uptake and catabolism of a lignin-derived biphenyl in *Sphingobium* sp. strain SYK-6.
○新沼 皐、荒木 拓馬、上村 直史、政井 英司（長岡技科大工）
○Ko NIINUMA, Takuma ARAKI, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン由来二量体芳香族化合物である 5,5′-デヒドロジバニリン酸 (DDVA)資化菌として単離され、現在までに世界で最もリグニン代謝系が明らかとなっている細菌である。SYK-6 株において DDVA は、外膜および内膜トランスポーターである TbtA および DdvK によって細胞内に取り込まれた後、LigXaXcXd、LigZ、LigY、そして LigW/LigW2 によりそれぞれ脱メチル、芳香環開裂、側鎖開裂、脱炭酸を受けバニリン酸に変換されて代謝される。SYK-6 株のゲノム上において、*tbtA, ddvK, ligZ*, *ligY, ligXa* ならびに *ligXa* 直上流逆向きに存在する MarR 型転写制御因子である *ddvR* はクラスターを形成している。昨年度の本大会において、1) これら遺伝子クラスターが *tbtA*, *ddvK*, *ligZ* および *ligY* を含む *tbtA* オペロン、*ligXa* オペロンおよび *ddvR* オペロンで構成されること、2) *tbtA* および *ligXa* オペロンの転写は DDVA 培養時に誘導されるが *ddvR* オペロンの転写は構成的であること、3) *tbtA* および *ligXa* オペロンの転写が DdvR によって負に制御されることを報告した。本研究では、*tbtA* および *ligXa* オペロンの転写制御機構の詳細を明らかにするため、両オペロンの誘導物質の同定ならびに DdvR の DNA 結合解析を行った。
【方法】DDVA 存在下および非存在下で培養した DDVA 変換能欠損株 (Δ*ligXc*)から RNA を単離し、逆転写反応により調製した cDNA を鋳型に用いた定量 PCR (qRT-PCR)解析により *tbtA*, *ddvK*, *ligZ*, *ligY* および *ligXa* の転写量を測定した。N 末端に His-tag を融合した DdvR を大腸菌で生産させ、Ni カラムにより精製した。*tbtA* および *ligXa* オペロンの上流領域を PCR 増幅し、ジゴキシゲニン標識した。得られた DNA プローブと精製 DdvR を用いてゲルシフト解析を行った。
【結果・考察】DDVA 変換能を欠損した Δ*ligXc* における *tbtA*, *ddvK*, *ligZ*, *ligY* および *ligXa* の転写誘導性を評価した。その結果、これら遺伝子の転写は DDVA 存在下で野生株と同等に誘導されることが示され、DDVA が *tbtA* および *ligXa* オペロンの誘導物質として機能することが明らかとなった。*tbtA* および *ligXa* プローブと精製 DdvR を用いたゲルシフト解析の結果、両プローブにおいて DNA-DdvR 複合体を示すシフトバンドが観察され、DdvR が *tbtA* および *ligXa* オペロンの上流領域に結合することが明らかとなった。また、両プローブ内には *tbtA* および *ligXa* の開始コドンからそれぞれ 238 bp および 58 bp 上流に互いに類似した inverted repeat (IR)配列が見出されたことから、DdvR がこれら IR 配列を認識して結合することが推察された。現在、DdvR の DNA 結合配列と IR 配列の関係を精査するとともに、DDVA のエフェクターとしての効果をゲルシフト解析で調べている。

lignin, biphenyl, transcriptional regulation

発表責任者：新沼　皐（s153384@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2A06p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A06 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株におけるシリンガ酸分解酵素遺伝子の転写制御因子の同定と機能解析
Identification and characterization of an IclR family transcriptional regulator for the syringate catabolic genes in *Sphingobium* sp. strain SYK-6.
○荒木 拓馬、上村 直史、政井 英司（長岡技科大工）
○Takuma Araki, Naofumi Kamimura, Eiji Masai (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】リグニン由来化合物分解菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 株は，リグニンの主要な単位構造であるグアイアシル型またはシリンギル型構造を有する様々なリグニン由来化合物を，それぞれバニリン酸 (VA)とシリンガ酸 (SA)に集約して代謝する．SYK-6 株において VA は，LigM による脱メチルを受けプロトカテク酸 (PCA)に変換され PCA 4,5-開裂経路によって代謝される．一方 SA は，DesA と LigM による脱メチルによりガリック酸に変換され DesB によって芳香環開裂を受けて代謝される．これまでに発表者らは，*desA*, *ligM*, *desB* の転写が VA または SA 存在下で 5～40 倍の誘導を受けること，*ligM* と *desB* の転写が MarR 型転写制御因子である DesR によって負に制御されること，そして *desA* の転写制御に DesR は関与しないことを明らかにした．しかし，*desA* の転写制御機構の詳細は依然として不明である．本研究では，SYK-6 株における *desA* の転写制御機構の解明を目的として，*desA* の転写制御因子の探索を行った．

【方法・結果・考察】*desA* の転写制御因子に関する知見を得るため，5 mM SA または VA 誘導条件および非誘導条件で培養した SYK-6 株の細胞抽出液と推定の *desA* プロモーター領域を含む DNA プローブを用いてゲルシフト解析を行った．その結果，いずれの細胞抽出液を用いた場合でも DNA-蛋白質複合体を示すシフトバンドが観察された．また，SA と VA およびそれらの代謝中間体の存在下で結合反応を行ったところ，SA 存在下でのみシフトバンドが形成されなかった．これらの結果から，SYK-6 株の細胞内には *desA* 上流領域へ特異的に結合し，SA をエフェクターとして認識する転写制御因子が存在すると推察された．SYK-6 株のゲノム上の *desA* 周辺領域に着目したところ，*desA* 上流にはフェルラ酸代謝に関与する *ferBA* オペロンとその転写制御を担う MarR 型転写制御因子である *ferC* が存在する．一方で，*desA* 下流には IclR 型転写制御因子と相同性を示す機能未解明の遺伝子 *desX* が見出された．FerC と DesX の SA 代謝制御への関与を調べるため，SYK-6 株の *desX* 内部領域を欠失させた破壊株 (Δ*desX*)を作製し，本株と以前構築された *ferC* 破壊株 (Δ*ferC*)の 5 mM SA での生育能を野生株と比較した．その結果，Δ*ferC* の SA 生育能は野生株と同等であったが，Δ*desX* は野生株よりも有意に生育が早くなった．また，Δ*desX* の細胞抽出液と *desA* プロモータープローブを用いたゲルシフト解析を行った結果，野生株で検出されたシフトバンドが形成されなかった．以上の結果から，SYK-6 株において DesX は *desA* の転写を負に制御するリプレッサーとして機能することが示唆された．

Syringate, Transcriptional regulation, *Sphingobium* sp. SYK-6

講演番号：2A07a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A07 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の delta 12-fatty-acid desaturase の機能解析
Identification and characterization of delta 12-fatty-acid desaturases in *Lipomyces starkeyi*
○松沢 智彦[1]、前原 智子[1]、神坂 泰[1]、荒 学志[2]、高久 洋暁[2]、矢追 克郎[1] ([1]産総研 生物プロセス、[2]新潟薬大 応生科)
○Tomohiko MATSUZAWA[1], Tomoko MAEHARA[1], Yasushi KAMISAKA[1], Satoshi ARA[2], Hiroaki TAKAKU[2], Katsuro YAOI[1] ([1]AIST, [2]NUPALS)

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、グルコースだけでなく、デンプン・キシロース・セロビオースなどの様々な糖質を資化し、細胞内に脂肪球という形で油脂を蓄積する非常にユニークで産業的に有用な酵母である。しかし、本酵母の油脂合成に関与する酵素およびそれをコードする遺伝子には未解明な点が多い。本研究では、*L. starkeyi* の delta 12-fatty-acid desaturase をコードすると予想される２つの遺伝子を *L. starkeyi* およびモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させ、その機能を同定した。２つの遺伝子のうち、１つは delta 12-fatty-acid desaturase をコードしているのに対し、もう１つの遺伝子がコードするタンパク質は delta 12-fatty-acid desaturase 活性に加えて delta 15-fatty-acid desaturase 活性も有していることが明らかになった。*L. starkeyi* における delta 12-fatty-acid desaturase の過剰発現株がリノール酸（C18:2）を蓄積することから、本遺伝子が不飽和脂肪酸の生産に資する重要な遺伝子であることが明らかになった。また、本酵素をコードする遺伝子の発現解析などから得られた知見を基に、これらの酵素の *L. starkeyi* における生理学的な意義についても考察する。

yeast, fatty-acid desaturase, lipid

講演番号：2A07a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A07 会場

赤色油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* の油脂高蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析
Isolation and characterization of red oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* mutants with high lipid accumulation

○風間 春香[1]、岡 由佳[1]、小林 鈴花[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、森 一樹[4]、油谷 幸代[4]、荒木 秀雄[5]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]産総研 CBBD-OIL、[5]不二製油グループ本社)
○Haruka KAZAMA[1], Yuka OKA[1], Suzuka KOBAYASHI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Kazuki MORI[4], Sachiyo ABURATANI[4], Hideo ARAKI[5], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. & Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界人口の増加や食生活の変化、バイオ燃料の使用増加に伴い、油脂の需要が増え続けているが、日本の油脂自給率は主要先進国と比較して極めて低く、国内への油脂の安定供給のためには日本独自の生産システムの構築が必要である。そこで本研究では、様々な糖を資化し、細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* に注目した。*R. toruloides* が生産する油脂の組成は、植物油に類似しているほか、カロテノイド及びコエンザイム Q10 を含有するため、付加価値の高い健康油脂を生産できる可能性を有する。しかしながら、*R. toruloides* を産業利用するには、油脂生産性の向上が必要である。そこで本研究では、油脂高蓄積変異株株を取得し、その変異株の油脂生産性の解析を行い、産業利用への可能性を検討した。

本研究では、高効率で油脂高蓄積変異株を取得するため、Percoll 試薬を用いた密度勾配遠心法による油脂高蓄積変異細胞の濃縮を試みた。水と油の密度の違いから、油脂高蓄積細胞は低密度画分に分離すると考え、EMS で変異を導入した変異細胞群を密度勾配遠心分離し、低密度画分を分取、培養、遠心分離という濃縮サイクルを 4 回行った。菌体層の浮上、フローサイトメトリー解析により濃縮を確認した後、回収した濃縮画分をプレートに撒き、油脂高蓄積候補株群をコロニー単離した。その後これら候補株群について、顕微鏡観察を指標に一次スクリーニングを行い、選抜された株を細胞あたりの油脂蓄積量を選抜指標とした二次スクリーニングを行った。その結果、油脂高蓄積変異株 E1-11、E2-32 の 2 株を取得した。さらに、この 2 株の油脂高蓄積変異株について表現型解析を行ったところ、対糖油脂変換率、 油脂含有率は、野生株とほぼ同等であったが、細胞あたりのグルコース消費速度は速く、培養 4 日目の細胞あたりの油脂含有量は野生株細胞の約 1.5 倍であった。また両変異株とも野生株よりも細胞が大きかった。以上のことから、取得した油脂高蓄積変異株の細胞は、グルコースを含む栄養源を資化する速度が野生株細胞より速く、細胞が巨大化する変異細胞であることが考えられる。また、資化速度が速いことから、油脂生産時間の短縮を可能にする変異株である。今後は、マイクロアレイ解析やゲノム比較解析による変異遺伝子の同定・解析などにより、他の酵母等の細胞巨大化への応用、また、本変異株を親株として、対糖油脂変換率が向上した油脂高蓄積変異株の育種へ繋げるなどの展開が考えられる。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Rhodosporidium toruloides*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A07a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A07 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂超高蓄積変異株の取得及び油脂蓄積重要遺伝子の同定
Isolation of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutants with high lipid accumulation and identification of important genes for lipid accumulation

○春日 琴葉[1]、海老名 沙也佳[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、森 一樹[4]、油谷 幸代[4]、荒木 秀雄[5]、高久 洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]産総研 CBBD-OIL、[5]不二製油グループ本社）
○Kotoha KASUGA[1], Sayaka EBINA[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Kazuki MORI[4], Sachiyo ABURATANI[4], Hideo ARAKI[5], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. & Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

日本の油脂は海外からの輸入に大きく依存しており、自給率の向上は急務である。地球温暖化による天候リスク、日本の農業人口の減少、国土面積を考慮すると、油糧植物からの油脂獲得は困難である。そこで本研究ではデンプン、グルコース、キシロースをはじめたとした様々な糖を資化し、細胞内に脂肪球という形で油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。また、*L. starkeyi* が生産する油脂は植物油と類似の脂肪酸組成で構成され、植物代替油脂としても有望である。しかしながら、*L. starkeyi* の産業活用のためには、油脂生産性（油脂生産速度、対糖油脂変換率）の向上が課題であるが、*L. starkeyi* の油脂合成・分解・蓄積に関する遺伝子の知見は少なく、その機構の詳細は解明されていない。そこで本研究では油脂を高蓄積する変異株を取得し、野生株と変異株の油脂合成・分解・蓄積に関する遺伝子の発現比較解析から油脂の高生産に重要な遺伝子を特定することを目的とした。

本研究室では、細胞当たりの油脂蓄積量が野生株の 1.8 倍を示す油脂高蓄積変異株 HA (High Accumulation)15 株をすでに取得している。本研究では、野生株との油脂合成・分解・蓄積に関する遺伝子発現比較において、比較対象株を HA15 株だけでなく、さらに油脂蓄積量が向上した変異株（油脂超高蓄積変異株）も比較対象とすることにより、油脂の高生産に関与する重要な遺伝子の特定の可能性が向上すると考えた。そこで、油脂超高蓄積変異株を取得するため、油脂高蓄積変異株 HA15 株に対し UV で変異を誘発させた細胞群を培養し、Percoll 密度勾配遠心法で油脂超高蓄積変異株群の濃縮を試みた。密度勾配遠心法は水と油脂の密度の違いから油脂を高蓄積した細胞を上層に分画することができる。この原理を利用して、密度勾配遠心分離、上層分取、培養を繰り返すことで油脂超高蓄積変異株の濃縮を行った。その際 HA15 株をコントロールとし、HA15 株よりもさらに低密度画分に存在する細胞群を濃縮した。コロニー単離した株を二段階でスクリーニングし、細胞あたりの油脂蓄積量が野生株の 4.6 倍、油脂高蓄積変異株 HA15 株の 2.3 倍に上昇した油脂超高蓄積変異株 UHA (Ultra High Accumulation)15-11 を取得した。現在、野生株、HA15 株、UHA15-11 株における油脂合成・分解・蓄積に関する遺伝子の発現比較を行っている。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A07a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A07 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析
Isolation and characterization of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutants with low lipid accumulation

○酒井 里佳子[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[4]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]不二製油グループ本社)
○ Rikako SAKAI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Hideo ARAKI[4], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年の急激な世界人口増加に伴い、食・工業・エネルギー利用への油脂需要が高まり、油脂の競合が懸念される中、日本の油脂自給率はわずか 3%（カロリーベース）で大半を輸入に頼っている状況である。さらに自然災害や異常気象による不作で輸入相手国からの供給が滞る可能性もあり、世界的に油脂需要が高まっている中、日本の油脂低自給率は早急に解決しなければならない課題である。そこで本研究では、菌体内に油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* は、食品・醸造残さなどの廃棄物由来の様々な糖を油脂に変換でき、その油脂は植物油に類似した脂肪酸組成を有するため植物代替油脂として活用できる。また、培養槽における油脂生産のため、気候、天候に左右されず、さらに広大なスペースを必要としない。このように *L. starkeyi* による油脂生産は多くの利点を持つが、産業化へ向け、育種や遺伝子工学的技術による油脂生産性の向上が必要である。しかし、*L. starkeyi* の油脂合成・分解・蓄積メカニズムについての知見は少なく、産業利用していく上ではメカニズム解明が必要である。本研究では、油脂低蓄積変異株を取得し、油脂合成・蓄積・分解メカニズムの解明を目的とした。

本研究室ではこれまでに油脂分解能が向上したと考えられる油脂低蓄積変異株 m45、m47 株を取得している。そこで本研究では、上記油脂低蓄積変異株とは異なる特徴をもった油脂低蓄積変異株の取得を試みた。野生株 *L. starkeyi* CBS1807 に UV を照射し、突然変異誘発を行った後、Percoll 試薬を用いた密度勾配遠心分離により油脂低蓄積変異株画分を濃縮した。Percoll 試薬は遠心分離によって密度勾配を形成するため、水と油の密度の違いを考慮すると油脂割合の小さい油脂低蓄積細胞は、遠心分離後に下層の高密度画分に存在すると予想された。m45 株が形成する菌体層よりも高密度画分を分取することで m45 株と同程度以上の油脂低蓄積性を示す変異株の取得を試みた。高密度画分の分取、培養、密度勾配遠心分離を繰り返して 4 回濃縮を行い、濃縮画分からコロニー単離を行った。得られた候補株を一次スクリーニングでは、①細胞濃度測定による生育、②顕微鏡観察による脂肪球の大きさの項目に着目し、次いで二次スクリーニングでは、油脂染色試薬 Nile Red を利用した蛍光顕微鏡観察による脂肪球の大きさや数の項目に注目してスクリーニングを行った。その結果、非常に小さな脂肪球を複数有する変異株など、脂肪球の大きさや数のパターンが異なる株を取得した。現在はこれらの変異株について、さらに詳細な油脂生産性等の表現型解析を行っている。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A07a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A07 会場

脂質工学への展開を視野に入れた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の簡易的形質転換系の開発

Development of easy transformation system in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for lipid engineering

○宮島 温美[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[4]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]不二製油グループ本社)
○ Atsumi MIYAJIMA[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Hideo ARAKI[4], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界的な人口増加に伴う油脂需要の増加やバイオ燃料原料としての油脂の新需要が、日本をはじめとした油脂自給率が低く、輸入に依存している国々における油脂の安定供給への懸念を引き起こしている。地球温暖化による天候リスク、農業人口減少、栽培地の限界問題などから、油糧植物による油脂生産だけでなく、油糧微生物による油脂生産が注目されている。そこで我々は菌体内に油脂を 70%以上も脂肪球として蓄積するユニークな油糧微生物である油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* を産業的に活用するならば、油脂合成・分解・蓄積メカニズムの詳細を解明し、その知見を活用して、油脂高蓄積株や高付加価値油脂蓄積株の創製が想定されるが、これらを実施するには遺伝子組換えシステムの開発が必須である。これまでに遺伝子組換えシステムの基礎となる形質転換法として *L. starkeyi* においてスフェロプラスト PEG 法、酢酸リチウム（LiAc）法、アグロバクテリウム法が開発されてきたが、一般的に簡便で効率がいいとされているエレクトロポレーション法については開発報告がない。そこで本研究ではエレクトロポレーション法を開発することで *L. starkeyi* の遺伝子組換えシステムを充実させ、*L. starkeyi* の産業利用の促進を目的とした。

L. starkeyi Δ*lslig4* 株（遺伝子ターゲティング効率を向上させた株）の染色体上に 数十コピー存在すると考えられる 18S rDNA 領域を標的部位とし、選択マーカーにハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた遺伝子挿入コンストラクトを用いてエレクトロポレーション法の検討を行った。*Saccharomyces cerevisiae* のエレクトロポレーション法を参考に、培養菌体を LiAc と DTT で処理後、無菌水で洗浄、 1 M ソルビトール で懸濁、遺伝子挿入コンストラクトをと混合して、電気パルスをかけた。その後 SD + ハイグロマイシン 固体培地にプレーティングし、30℃ で 4 日培養後、コロニー形成数を測定した。パルス条件（C=25 μF、PC=200Ω、V=0.8 kV）の時に、比較的多数のコロニーが得られた。また、菌体の DTT、LiAc による前処理なしの形質転換ではコロニーが得られなかったことから、DTT と LiAc の前処理は形質転換に必須であり、処理濃度の検討を行ったところ 50 mM DTT、0.2 M LiAc の前処理条件が最適であることがわかった。さらに *L. starkeyi* では等張液処理を 0.25 ～ 0.5 M のスクロースで実施し、形質転換を行ったところ、1 μg DNA あたり 1000 以上のコロニーを得ることに成功した。現在、形質転換効率を向上させるため、パルス条件の最適化を行っている。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, transformation

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A07a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A07 会場

油脂生産性向上へ向けた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の脂質工学的改変
Lipid engineering oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for enhanced production of lipid
○小林 鈴花[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[4]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]不二製油グループ本社)
○ Suzuka KOBAYASHI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Hideo ARAKI[4], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界の油脂需要は、エネルギー問題、急激な人口増加、食の欧米化等の理由により増加している。しかし、我が国の油脂自給率は非常に低く、重量ベースで 13%程度である。それゆえ国内の油脂は世界情勢の変化や気候変動による価格変動のリスクにさらされており、日本独自の油脂生産方法を早急に確立する必要がある。本研究で扱っている油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、様々な糖を資化し、菌体内に脂肪球の形で油脂を蓄積するため、国内に大量に存在する廃棄バイオマス由来の糖化液から持続的な油脂生産への貢献が期待できる。また、*L. starkeyi* の生産する油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）の脂肪酸組成は植物油脂と類似しているため、植物油脂と代替が可能であり、我が国の油脂自給率向上への貢献が期待できる。しかし、*L. starkeyi* の産業利用を考えた場合、油脂生産性に課題があり、育種や遺伝子工学技術を用いた油脂生産性の向上は必須であるが、この酵母の油脂蓄積メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで本研究では、本研究室で取得した油脂高蓄積変異株の油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析結果から、*L. starkeyi* の油脂高蓄積性に対して重要性が示唆された遺伝子の過剰発現株を作製し、その油脂蓄積への寄与を明らかにすることを目的とした。

L. starkeyi において、脂肪酸合成の出発物質であるアセチル CoA は、酢酸を経由する経路とクエン酸を経由する経路の 2 つの経路から供給されている。昨年度の大会で報告した油脂高蓄積変異株 K13、K14 について、RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行った結果、どちらの株も野生株と比較して、酢酸を経由する経路に関与する遺伝子の発現は低く、クエン酸を経由する経路の遺伝子の発現は高いことが明らかとなった。このことから、*L. starkeyi* の油脂蓄積にはクエン酸を経由したアシル CoA 合成経路遺伝子の高発現が重要であることが示唆されたため、その経路の上流に位置するクエン酸をアセチル CoA とオキサロ酢酸に変換する酵素をコードする *ACL1*、*ACL2*、その 1 段階下流に位置し、アセチル CoA をマロニル CoA に変換する酵素をコードする *ACC1* の遺伝子高発現株を作製した。培養 3 日目における顕微鏡観察による形質の確認と、RT-PCR を用いた遺伝子発現解析の結果、特に *ACL1* の高発現株において、野生株に比べて顕著な発現の増加と大きな脂肪球が観察された。現在、取得した遺伝子高発現株の油脂定量を行っている。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A07a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A07 会場

Expression of cyclooxygenase from the red alga, *Gracilaria vermicuphylla* in filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○Mohd Fazli FARIDA ASRAS[1], Hideaki NAGANO[1], Yoshimi SHIMADA[1], Miho TAKEMURA[3], Shigenobu KISHINO[1], Akinori ANDO[1,2], Jun OGAWA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Ins. Biore. Biotech., Ishikawa Pref. Univ.)

Mortierella alpina 1S-4 is an arachidonic acid (ARA)-producing microorganism. ARA is known to be a biogenetic precursor of prostaglandins and leukotrienes. One of the prostaglandins, PGF2α is synthesized by cyclooxygenase (COX) which also known as prostaglandin H synthase. PGF2α is a vital bioactive molecule in pharmaceutical industries especially on the regulation of physiological processes e.g. blood circulation and that of pathological conditions e.g. digestion and reproduction. However, PGF2α is limited in nature and has been widely synthesized chemically, yet hardly been produced by any biological process especially by microorganism. In this study, we tested to produce PGF2α by expressing COX gene from *Gracilaria vermicuphylla* in *Mortierella alpina* 1S-4.

We constructed binary vectors which contain GvCOX gene regulated by two constitutively promoters, His550 with a modest expression level and SSA2 with a higher expression level, and introduced them to *Mortierella alpina* 1S-4 by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. A few successful transformants with the promoter His550 were obtained which were capable to produce PGF2α under an optimal condition. The presence of PGF2α was detected within the cell with approximately 0.9 μg/mg of dry cell weight whilst in the cultured medium, approximately 6 μg/mL. The production of PGF2α with the His550 promoter was sluggish from 3 to 9 days of the fermentation as compared to that with the SSA2 promoter which consistently increased until the end of the fermentation period. As a result, the transformants presented the promising PGF2α production with approximately 6 μg/mL culture medium under optimal conditions. These promising findings provide a solid base for further investigations subsequently enhancing the yield of bioactive products.

cyclooxygenase, prostaglandin F2α, *Mortierella alpina* 1S-4

講演番号：2A07a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A07 会場

油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種による遊離脂肪酸生産に関する検討
Free fatty acid production by *Mortierella alpina* molecular breeding
○島田 良美[1]、安藤 晃規[1]、岸野 重信[1]、櫻谷 英治[2]、小川 順[1] ([1]京都大学大学院農学研究科、[2]徳島大学生物資源産業学部)
○Yoshimi Shimada[1], Akinori Ando[1], Shigenobu Kishino[1], Eiji Sakuradani[2], Jun Ogawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokushima Univ.)

【緒言】

アラキドン酸の商業生産菌として利用されている糸状菌 *Mortierella alpina* は、重量比で最大約 60%の脂質を蓄積する。脂質は主にトリアシルグリセロール（TAG）として蓄積されるが、化成品、医薬品などの脂肪族化合物の原材料として供給する場合には、反応性の高い遊離脂肪酸(FFA)の形態がより有利である場合がある。そこで本発表では、遊離脂肪酸生産性の高い菌株を得ることを目的に、本菌を宿主として脂肪酸代謝に関わる遺伝子の過剰発現を試みたので報告する。

【方法および結果】

Mortierella alpina の遊離脂肪酸生産性の向上に関わる候補酵素としてチオエステラーゼおよびリパーゼに着目した。それぞれの酵素をコードする遺伝子を本菌のゲノム情報に基づき、cDNA を鋳型として増幅後、本菌由来の過剰発現プロモーターSSA2 にて制御した過剰発現ベクターを構築した。宿主には *M. alpina* のウラシル要求性株を用い、アグロバクテリウム法により形質転換株を得た。得られた形質転換株を GY(glucose 2 %, yeast extract 1%)培地で培養し、菌体を破砕後、Bligh Dyer 法により抽出した総脂質を TLC および GLC に供し、脂質生産性、脂質組成および脂肪酸組成を検討した。形質転換株は宿主株と遜色のない旺盛な生育、脂質生産性を示した。脂質組成は宿主株同様 TAG が主要生産物であったが、遊離脂肪酸の生産性が向上した株が数株得られた。遊離脂肪酸組成を調べたところ、総脂質の脂肪酸組成とは異なっていることがわかった。つまり、遊離脂肪酸では飽和脂肪酸の割合が増加しており、本菌の総脂質に特徴的に蓄積する、アラキドン酸をはじめとする長鎖不飽和脂肪酸の占める割合は相対的に低下していた。

Mortierella alpina, lipid production, free fatty acid

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A07a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A07 会場

廃グリセロール資化性糸状菌が生産する脂肪酸代謝産物
Fatty acid metabolites produced by the crude glycerol assimilating filamentous fungus
○村川 直美[1]、加納 みずほ[1]、阪本 鷹行[1]、安藤 晃規[2]、岸野 重信[2]、相馬 悠希[3]、和泉 自泰[3]、馬場 健史[3]、小川 順[2]、櫻谷 英治[1] ([1]徳島大生物資源、[2]京大院農応用生命、[3]九大生医研)
○Naomi MURAKAWA[1], Mizuho KANOH[1], Takaiku SAKAMOTO[1], Akinori ANDO[2], Shigenobu KISHINO[2], Yuki SOMA[3], Yoshihiro IZUMI[3], Takeshi BAMBA[3], Jun OGAWA[2], Eiji SAKURADANI[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyusyu Univ.)

【背景・目的】　近年，廃植物油を原料としたバイオディーゼル燃料が製造されているが，その製造過程における副産物として大量の廃グリセロールが生成される。廃グリセロールから純度の高いグリセロールを精製する技術が確立されているものの，精製コストが高いため，その大部分は焼却処分されている。現在，廃グリセロールの有効な用途開発が希求されている。

グリセロールは粘性が高いため，微生物培養の炭素源としてグリセロールを高濃度で使用した場合，生育阻害が起こることがある。また、廃グリセロールには生育阻害を引き起こす様々な有機物や無機塩が含まれており，多くの微生物は廃グリセロールを含有する培地で生育できない。本研究室ではこれまでに，廃グリセロールや純グリセロールを炭素源とした培地で良好に生育する微生物を選抜し，脂質生産性を評価することで，比較的高い脂質生産性を示す微生物を獲得することに成功した。本発表では，廃グリセロール資化性微生物のなかからユニークな脂肪酸を生産する糸状菌について報告する。

【方法・結果】　自然界の土や水を単離源として，4%廃グリセロールを含む寒天培地上で良好に生育する糸状菌を得た。廃グリセロールを含む培地で本菌株を培養し，菌体の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析したところ，一般的な飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸だけでなく，それらと保持時間の異なる 2 つのピークが検出された。ガスクロマトグラフィー質量分析に供した結果，これらの化合物は炭素数 18 の水酸化脂肪酸およびオキソ脂肪酸であることが示唆された。一方，本糸状菌をグルコースまたは純グリセロールを炭素源とした培地で培養したところ，これらの希少脂肪酸の生産は確認されなかった。また，振とう培養後に 4 日間以上静置培養を行うことによって，これら希少脂肪酸の生産性が向上することがわかった。

hydroxy fatty acid, oxo fatty acid, crude glycerol

講演番号：2A07a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A07 会場

麹菌を用いた遊離型高度不飽和脂肪酸の生産化
Polyunsaturated free fatty acid production via heterologous gene expression in *Aspergillus oryzae*
○玉野 孝一[1]、コックス ロバート[2]、柘植 謙爾[2]、三浦 愛[1]、伊藤 あやの[3]、石井 純[2]、田村 具博[1]、近藤 昭彦[2]、町田 雅之[1]([1]産総研生物プロセス、[2]神戸大院イノベ、[3]北海道ハイテク専門学校)
○Koichi TAMANO[1], Robert Cox[2], Kenji Tsuge[2], Ai Miura[1], Ayano Itou[3], Jun Ishii[2], Tomohiro Tamura[1], Akihiko Kondo[2], Masayuki Machida[1] ([1]AIST, [2]Kobe Univ., [3]Hokkaido High-Tech. Col.)

微生物が生産する遊離脂肪酸（FFA）やその誘導体には、医薬品・バイオ燃料・健康補助食品やその原料として利用可能なものがある。そこで、物質生産と安全性に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を生産宿主として、代謝工学的な改変を加えることで、FFA の高生産化にこれまでに取り組んできた。その結果、アシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊により、FFA 生産性を野生株の 9.2 倍にまで増大させることに成功した(参考文献 1)。そこで今回は FFA の高機能化に取り組んだ。具体的には、医薬品等に使用される FFA は高度不飽和型であることから、麹菌の FFA の高度不飽和化に挑戦した。

faaA 破壊株は本来、4 種類の FFA（パルミチン酸・ステアリン酸・オレイン酸・リノール酸）を生産する。これらの FFA の中で最も高度不飽和化されたリノール酸を基質として、さらにその高度不飽和化に働く酵素遺伝子 3 種類を他の微生物から単離して、*faaA* 破壊株に導入することとした。3 種類の遺伝子は、⊿6 デサチュラーゼ・エロンゲース・⊿5 デサチュラーゼをコードしている。これらの遺伝子を麹菌に一度の形質転換で導入するためには、15.1 kb ものDNA 断片を調製する必要があった。そこで長鎖 DNA 構築技術である OGAB 法により DNA 断片を調製した。当 DNA 断片で *faaA* 破壊株を形質転換して、染色体 *sC* 遺伝子座に当 DNA 断片が相同組換えで組み込まれた“ARA1 株”を構築した。ARA1 株は、遊離型リノール酸から 1 段階酵素反応が進んだ遊離型ガンマリノレン酸（GLA）、および 2 段階反応が進んだ遊離型ジホモガンマリノレン酸（DGLA）を生産することが確認された。しかし、最終代謝産物である遊離型アラキドン酸（ARA）の生産は確認されなかった。そこで現在、遊離型 ARA の生産に向けて問題の解決に取り組んでいる。

一方、*faaA* 破壊株に⊿6 デサチュラーゼ遺伝子、または⊿6 デサチュラーゼとエロンゲースの両遺伝子だけを導入した株も構築して、遊離型 GLA や遊離型 DGLA の生産の方向性でも研究を行っている。これらの株は、ARA1 株から⊿5 デサチュラーゼとエロンゲースの両遺伝子、または⊿5 デサチュラーゼの遺伝子だけを相同組換えにより除去することで構築した。その結果、遊離型 GLA は最大 4.6%、遊離型 DGLA は最大 8.2%の構成比で生産されることが確認された。今後は、さらなる遺伝子組換えや培養条件の改良を行うことで、生産量をさらに増やす方法を検討していきたい。

(参考文献 1)
Tamano et al. (2015) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99(7)**:3103-3113

Aspergillus oryzae, Polyunsaturated free fatty acid, Heterologous production

発表責任者：玉野　孝一（tamano-k@aist.go.jp）

講演番号：2A07a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A07 会場

人工 DNA 切断酵素 TALEN と一本鎖 DNA を用いた *Rhizopus* 属糸状菌における高効率相同組換え技術の確立

Efficient genome editing in the fungus *Rhizopus* by programmable nucleases, TALEN, and ssDNA

○壺井 雄一[1]、金田 実郎[1]、高橋 史員[1]、五十嵐 一暁[1]、瀧村 靖[1]、佐久間 哲史[2]、山本 卓[2]([1]花王・生科研、[2]広島大院・理)

○Yuichi TSUBOI[1], Jitsuro KANEDA[1], Fumikazu TAKAHASHI[1], Kazuaki IGARASHI[1], Yasushi TAKIMURA[1], Tetsushi SAKUMA[2], Takashi YAMAMOTO[2] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Grad. Sch. of Sci., Hiroshima Univ.)

【背景】*Rhizopus* 属糸状菌は、乳酸やフマル酸をはじめとする有機酸類を高生産することで知られており、バイオケミカルス生産菌として期待されている。さらなる高生産化を目指した菌株育種には遺伝子組換えが有用であるが、*Rhizopus* 属菌に関しては遺伝子導入の報告例が少なく、また、遺伝子破壊の報告例は一例しかない。これは主に、相同組換え能が極めて低いためと、線状の二本鎖 DNA を環状化し複製起点がなくても複製するため、と考えられている。本検討では人工 DNA 切断酵素の 1 つである Transcriptional activator-like Effector Nuclease (以下、TALEN)を用いて、*Rhizopus* 属菌における相同組換えによる効率的な相同組換え技術の確立を目的に検討を行った。

【手段・結果】*Rhizopus delemar*(以下、*R. delemar*)を宿主として、ランダム変異育種により *trpC* 遺伝子(トリプトファン合成遺伝子の 1 つ)が欠損した栄養要求性株を取得した。続いて *pyruvate decarboxylase* 遺伝子(以下、*pdc* 遺伝子)を標的とした TALEN を合成し、弊社にて開発した *Rhizopus* 属用遺伝子発現ベクターに連結して、TALEN 発現プラスミドとした。また相同組換え用プラスミドとして、遺伝子導入マーカーである *trpC* 遺伝子断片の両側に、*pdc* 遺伝子の 5’側と 3’側のゲノムとの相同配列をそれぞれ 1000 bp 付加したものを作製した。以下の相同組換え検討では、マーカーノックインプラスミドを鋳型に、PCR により作製した相同配列部分を含む DNA 断片を形質転換に用いた。

TALEN 発現プラスミドと二本鎖 DNA 断片（相同配列 1000 bp）を *R. delemar* に導入し、相同組換えによる *pdc* 遺伝子の破壊と *trpC* 遺伝子の導入を検討したところ、単離した 108 株全てにおいて相同組換えに失敗していた。これは、*Rhizopus* 属菌の性質である線状の二本鎖 DNA を環状化して複製起点なしでの複製が起こり、結果として、相同組換えが起こっていなくても菌が生育する偽陽性が頻出したためと推察された。そこで、ドナーDNA を「二本鎖 DNA」に代えて「一本鎖 DNA」として検討を行ったところ、単離した 8 株中 1 株において、相同組換えによる遺伝子破壊に成功した。また、必要な相同配列長の検討を行ったところ、最短で 50 bp にて相同組換えに到ることを確認した。加えて、近縁種である *R. oryzae* においても、同様の手法で相同組換えが可能であることを確認した。

【展望】本検討は、遺伝子破壊が困難と言われる *Rhizopus* 属菌において、相同組換えによる効率的な遺伝子破壊法を確立した初めての報告である。本技術を応用することで、今後 *Rhizopus* 属菌における代謝工学や基礎科学のさらなる発展が期待される。

genome editing, *Rhizopus*, homologous recombination

講演番号：2A07a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A07 会場

Rhizopus 属糸状菌における高発現プロモーターを利用した有用物質生産技術の開発
Isolation of high expression promoters in Rhizopus sp. and their use for fermentative production.

○金田 実郎、壺井 雄一、髙橋 史員、五十嵐 一暁、瀧村 靖（花王・生科研）
○Jitsuro KANEDA, Yuichi TSUBOI, Fumikazu TAKAHASHI, Kazuaki IGARASHI, Yasushi TAKIMURA (Biol. Sci. Res., Kao Corp.)

【背景】

Rhizopus 属糸状菌は、乳酸やフマル酸などを高生産するためバイオケミカルス生産菌の一つとして期待されている。本菌による乳酸やフマル酸生産においては、副生物としてエタノールを生産することが知られており、代謝改変による高生産化を目指した菌株育種が必要である。菌株育種の一つの手段として遺伝子組換えが有用であるが、*Rhizopus* 属菌に関しては遺伝子組換え育種の報告が乏しく、遺伝子組換えに関する基盤技術が十分には整備されていないのが現状である。そこで我々は、*Rhizopus* 属菌において遺伝子組換えによるバイオケミカルス高生産化技術開発を目的として、フマル酸生産菌である *Rhizopus delemar* にて高発現プロモーターを開発し、有用遺伝子の高発現によるフマル酸高生産株の構築を目指した。

【手段・結果】

第一に、ランダム変異育種によりトリプトファン要求性を示す株を作製し、これを遺伝子導入宿主株とするとともに、*trpC* 遺伝子（トリプトファン合成遺伝子の１つ）を遺伝子導入マーカーとして取得した。続いて、フマル酸生産培養時の網羅的な遺伝子転写量解析を行った。その結果、過去に報告がある高発現プロモーターより 2.5 倍以上高い転写量を示す遺伝子を複数種見出した。その中にはエタノール合成関連遺伝子である *alcohol dehydrogenase* 遺伝子（以下、*adh* 遺伝子）が含まれていた。

フマル酸の高生産に有用であることが報告されている *pyruvate carboxylase* 遺伝子（以下、*pyc* 遺伝子）の *adh* プロモーターによる発現強化、及び、TALEN と一本鎖 DNA を用いた相同組換えによるエタノール合成関連遺伝子である *pyruvate decarboxylase* 遺伝子（以下、*pdc* 遺伝子）の破壊を狙い、高発現 *adh* プロモーターに *pyc* 遺伝子を連結させた DNA 配列を *pdc* 遺伝子領域に knock-in した Δ*pdc*::P*adh*-*pyc* 株を作製した。この株のフマル酸生産性をコントロール株と比較したところ、消費グルコースからのフマル酸生産選択率及びフマル酸生産速度がそれぞれ 1.2 倍に向上していることが確認された。

【展望】

本発表技術を応用することで、遺伝子組換えによる有用物質の高生産化の報告例が少ない *Rhizopus* 属菌において、フマル酸をはじめとする有機酸類のさらなる高生産化やその他目的に沿った代謝改変に期待がもたれる。

Rhizopus, promoter, TALEN

発表責任者：瀧村　靖（takimura.yasushi@kao.com）

講演番号：2A07a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A07 会場

麹菌 *A. oryzae* 由来・製麹における主要 ACP アイソザイム二重欠失株の特性

Characteristics of the double deletant of major acid carboxypeptidase isozymes in koji making from *Aspergillus oryzae*

○山下 伸雄、窪寺 隆文、明石 貴裕（白鶴酒造（株））
○Nobuo YAMASHITA, Takafumi KUBODERA, Takahiro AKASHI (Hakutsuru sake brewing co. Ltd.)

【目的・背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 はゲノム中に 12 個のセリンカルボキシペプチダーゼ（ACP）ホモログ配列を持つことが明らかになっている。このうちいくつかは機能が報告され、アイソザイムをコードする遺伝子であることが分かっている。カルボキシペプチダーゼ 0 をコードする *ocp0* を欠失させると米麹の ACP 力価が約 65%低下したことから、清酒醸造においては最も主要な ACP と考察したが、⊿*ocp0* 株を用いた製成酒のアミノ酸度の低下は 1 割にすぎなかった。また固体培養特異的に高発現するとされるカルボキシペプチダーゼ 01 をコードする *ocpA* を欠失させた場合、力価の低下は約 15%であり、アミノ酸度の低下は 1 割程度だった。この現象を解明すべく *ocpA* と *oco0* の二重欠失株を取得し解析を行った。
【方法と結果】⊿*ligD 株*より取得した⊿*ocpA* 株（⊿*ligD::ptrA*, ⊿*ocpA::sC*, *niaD*）に *pyrG* マーカーを遺伝子ターゲッティングで導入し、⊿*ocp0::pyrG* を得ることで二重遺伝子欠失株（⊿*ocpA*⊿*ocp0*）を取得した。この株で製麹を行ったところ、米麹の状貌は wt 株や⊿*ocpA* 株や⊿*ocp0* 株と違いはなかった。しかし ACP 力価は著しく低下していた（wt 株に比べ約 75%低下）。糖化力は少し低下していたが、α-アミラーゼと酸性プロテアーゼは親株とほとんど変わらなかった。現在、菌体量を測定するとともに定量 RT-PCR を行い、製麹において欠失株で転写発現が上昇している遺伝子を調べている。製麹においては調べた ACP アイソザイム遺伝子の中では *ocpA* の転写が群を抜いて高かったが、米麹の ACP 力価に占める割合としては *ocp0* がコードするカルボキシペプチダーゼ 0 が主要であると考えられ、翻訳効率の差が示唆された。現在のところ、製麹において *ocpA* を欠失させると *ocp0* の転写発現が補完的に上昇する現象が確認されている。

acid carboxypeptidase, Aspergillus oryzae, deletant

発表責任者：山下 伸雄（yamashita@hakutsuru.co.jp）

講演番号：2A07a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A07 会場

シアン非感受性呼吸系酵素遺伝子とオキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子を高発現させた *Aspergillus niger* によるシュウ酸生産

Oxalic Acid Production by *Aspergillus niger* Overexpressing Genes Encoding Alternative Oxidase and Oxaloacetate Hydrolase.

○吉岡 育哲、小林 慶一、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Isato YOSHIOKA, Keiichi KOBAYASHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L は、高濃度 (100-150 g/L) のグルコースやスクロースを炭素源として利用し、クエン酸を高収率 (50-60%) で生産する。このような著量の糖を代謝する際には、補酵素 NADH を再酸化し解糖系の運行を維持する必要があり、このために alternative oxidase (AOX, EC. 1.10.3.11) による ATP を生成しないシアン非感受性呼吸系が利用されていると考えられる [1, 2]。一方、pH 5.5 以上あるいは高リン酸濃度の培養条件下では、サイトゾルに局在する oxaloacetate hydrolase (OAH, EC. 3.7.1.1) が誘導され、*A. niger* WU-2223L はシュウ酸を生産する。演者らは、糸状菌高発現プロモーターを使用して、OAH 遺伝子高発現株 *A. niger* EOAH-1 を作製し、30 g/L のグルコースから 9 日間で 28 g/L のシュウ酸生産を達成している [3]。本研究では、「OAH 遺伝子の高発現によるシュウ酸生産量の増大」に加えて、「AOX 遺伝子の高発現によるグルコース代謝速度の増大」を行った。すなわち、OAH 遺伝子と AOX 遺伝子の共発現株を作製し、シュウ酸高生産量を維持しながら生産速度の増大に利用した。

【方法および結果】

AOX をコードする遺伝子 *aoxA* [2] と OAH をコードする遺伝子 *oahA* [3] の両者を高発現させた EAOXOAH-1 株を作製した。30 g/L のグルコースを EOAH-1 株は 9 日間で 30 g/L のグルコースを消費したが、EAOXOAH-1 株は 7 日間で消費し、グルコース代謝速度の増大が認められた。また、EAOXOAH-1 株はクエン酸を副生せず 28 g/L のシュウ酸を生産し、EOAH-1 株と同等のシュウ酸生産量を示した。以上より、*aoxA* の高発現は、シュウ酸高生産量を維持しながらグルコースの代謝速度を増大させ、シュウ酸生産速度の増大に寄与することを明らかにした。さらに、EAOXOAH-1 株の培養条件の最適化によりシュウ酸のさらなる高生産を可能にした。

[1] K. Kirimura, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 2034-2039 (2000).
[2] K. Kirimura, et al., Curr. Genet., **34**, 472-477 (1999).
[3] K. Koboyashi, et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **41**, 749-756 (2014).

Alternative Oxidase, *Aspergillus niger*, Oxalic acid

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：2A07a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A07 会場

麹菌ミトコンドリア・ピルビン酸キャリアタンパク質欠損株におけるピルビン酸代謝フラックス改変による有用化合物生産

Redirection of pyruvate metabolic flux toward useful compound production through deficient for mitochondrial pyruvate carrier protein in *Aspergillus oryzae*

○張 斯来[1]、若井 暁[1]、荻野 千秋[2]、堤 浩子[3]、秦 洋二[3]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大イノベ、[2]神戸大工、[3]月桂冠・総研)

○Silai ZHANG[1], Satosi WAKAI[1], Chiaki OGINO[2], Hiroko TSUSUMI[3], Yoji HATA[3], Akihiko KONDO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ, [2]Dept. Chem. Eng., Grad. Sch., Kobe Univ, [3]Res. Inst., Gekkeikan)

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は細胞外に様々な糖化酵素を大量に分泌することが可能であり、植物バイオマスから有用物質を生産する宿主微生物として期待されている。我々は、従来のプラスチックの代替品となるポリエステル系のプラスチックであるポリ乳酸の原料となる物質である乳酸の生産に着目した。乳酸は解糖系の終点であり TCA 回路、エタノールやアミノ酸生産への分岐点となるピルビン酸から生産されるので、効率的な生産のためにはピルビン酸代謝を意識した代謝改変が必要である。現在までに栄養要求性株 *A. oryzae* NSPlD1 株に牛 (*Bos taurus*) 由来 lactate dehydrogenase をコードする遺伝子 (*bldh*) を導入し、エタノール生合成経路での pyruvate decarboxylase をコードする遺伝子を破壊した株 (BtLDH-*Δpdc*) では、100 g/L グルコースから約 49 g/L、100 g/L デンプンから約 42 g/L の乳酸生産に成功している。その際、ピルビン酸の主要な代謝経路である TCA 回路の中間代謝産物であるリンゴ酸およびコハク酸の分泌生産も確認された。本研究では、ピルビン酸の TCA 回路への流れを抑制する代謝フラックス改変による乳酸の生産性向上を試みた。

酵母では、ピルビン酸がミトコンドリア・ピルビン酸キャリアタンパク質の複合体によりミトコンドリアに取り込まれており、この複合体が三つのタンパク質 (Mpc1, Mpc2, Mpc3) から構成されている。麹菌ゲノム中から、これらのオーソログとして AO090023000796 と AO09000026000785 が見つかり、本研究ではそれぞれ MpcA および MpcB と命名した。BtLDH-*Δpdc* を宿主株とし、*mpc* の単独破壊株を作製し、乳酸生産を調べたところ、*ΔmpcA* では 100 g/L グルコースから約 83 g/L、*ΔmpcB* では約 68 g/L の乳酸生産に改善され、TCA 回路の中間代謝産物であるリンゴ酸およびコハク酸等の生産が著しく抑制された。また、ピルビン酸が *mpc* 破壊により培地中に 20 倍以上に分泌生産した。以上の結果から、*mpc* 破壊によりピルビン酸のミトコンドリアへの輸送が抑制され、ピルビン酸が乳酸生産に効率的に利用されたと考えられる。グルコースから高い乳酸生産を示した *ΔmpcA* のデンプンからの乳酸生産を調べた結果、100 g/L デンプンから約 61 g/L の乳酸生産に成功した。次に、*ΔmpcA* を宿主株とし、*An.ptrA* を用いたマーカーリサイクリングシステムを利用して *mpcB* の破壊を試みた結果、形質転換体が取得できなかった。このことから、*mpc* 二重破壊は生育不可能であると考える。今後、*mpc* に点変異導入を行い更なる乳酸生産性の上昇を試みる共に、ピルビン酸を出発物質とする他の有用化合物の生産株の構築を検討する予定である。

Aspergillus oryzae, mitochondrial pyruvate carrier protein, lactate

講演番号：2A07p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A07 会場

Aspergillus itaconicus の *cad* 遺伝子の同定と白麹菌のイタコン酸生産能の獲得
Identification of the *cad* gene of *Aspergillus itaconicus* and acquisition of ability of producing itaconic acid in *Aspergillus kawachii*

○野中 咲希[1]、久保 真紀[1]、二神 泰基[2]、高下 秀春[3]、小林 元太[1]、後藤 正利[1]（[1]佐賀大学農学部、[2]鹿児島大学農学部、[3]三和酒類（株））
○ Saki NONAKA[1], Maki KUBO[1], Taiki HUTAGAMI[2], Hideharu TAKASHITA[3], Genta KOBAYASHI[1], Masatoshi GOTO[1] ([1]Saga Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Sanwa Shurui Co.,ltd.)

【目的】工業原料として利用されるイタコン酸を生産する生物は、糸状菌 *Aspergillus terreus* と *A. itaconicus* が知られている。イタコン酸は *cis*-アコニット酸を基質としてシスアコニット酸脱炭酸酵素（Cad） の作用によって合成される。*A. terreus* では *cad* 遺伝子がすでに同定されているが、*A. itaconicus* では未同定である。イタコン酸を生産するにあたり *A. itaconicus* は生育が悪い。本研究では、*A. itaconicus* の *cad* 遺伝子をクエン酸を高生産する白麹菌 *A. kawachii* に導入することによりイタコン酸のより効率的な生産を目指している。本大会では *A. itaconicus* の *cad* 遺伝子の同定と *A. itaconicus cad* 遺伝子導入による白麹菌のイタコン酸生産能の獲得について報告する。
【方法と結果】まず、*A. itaconicus* NBRC 4336 株のドラフトゲノム配列に対して *A. terreus* NIH 2624 株の *cad* 遺伝子に相同な配列を BLAST により探索した。その結果、*A. terreus* の CadA のアミノ酸配列と 68%の相同性を示す CadA1、45%の相同性を示す CadA2 を見出した。*cadA1* 及び *cadA2* 遺伝子（cDNA）を大腸菌の pET 発現システムにより発現させた。発現タンパク質の可溶化に成功した CadA1 タンパク質の活性を調べた。*cis*-アコニット酸を基質とした反応が進行してイタコン酸を生成することを確認した。CadA2 は不溶化しており可溶化することができなかった。次に、*A. itaconicus* の *cadA1* 遺伝子を *sC* マーカーを保有する tetON 発現ベクターに挿入した。*A. kawachii ligD*$^{-}$*,argB*$^{-}$*,sC*$^{-}$ 株を宿主として *cadA1* 発現ベクターを用いて形質転換した。*cadA1* 遺伝子を保持する *A. kawachii* 形質転換体を取得した。形質転換体 10 株を有機酸生産用培地に接種した。*cadA1* 発現の誘導物質であるドキシサイクリン（Dox）を培養開始時に添加したものと、培養から 72 時間後に添加したものをそれぞれ 30℃ 160rpm で 2 週間、振とう培養をした。それぞれ培養開始から 1 週間後と 2 週間後の培養液を回収した後 HPLC を用いてイタコン酸量を測定した。その結果、イタコン酸を最も多量に生産した形質転換体は、培養 1 週間後でイタコン酸を 0.340 g/l 生産 しており、培養 2 週間後は 1 週間後よりも多量のイタコン酸の生産（1.00 g/l）を示した。10 種の形質転換体のうち Dox 添加時期によってイタコン酸生産量に違いがあった。培養 72 時間後に Dox を添加した方がより高いイタコン酸生産量を示す形質転換体の割合が多かった。

Aspergillus, *cis*-aconitate decarboxylase, itaconic acid

講演番号：2A07p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A07 会場

形質転換麹菌でのエルゴチオネインとセレノネインの生産

Production of ergothioneine and selenoneine in transformed koji molds

○原 精一、市川 惠一、篠原 靖智、五味 恵子（キッコーマン）
○Seiichi HARA, Keiichi ICHIKAWA, Yasutomo SHINOHARA, Keiko GOMI (Kikkoman Corp.)

【背景・目的】　エルゴチオネインはヒスチジンベタイン構造を持つ含硫アミノ酸の一種で、この物質が持つ抗酸化能に基づく様々な生理活性が報告されている。エルゴチオネインは植物やヒトを含めた動物にも保持されているが、これを生合成できるのは一部の細菌や真菌のみである。このうち、タモギタケやササクレヒトヨタケなどの担子菌から抽出したものが産業利用されている。

セレノネインはエルゴチオネインの硫黄がセレンに置き換わった構造の物質で、これまでにマグロなどの魚類から抽出・分離され、エルゴチオネインよりさらに強い抗酸化活性が報告されている。セレノネインは市販されていない。

麹菌においてもエルゴチオネインの生合成遺伝子が予測されており、これら遺伝子を強制発現させることにより、エルゴチオネイン、さらにセレノネインの麹菌での効率的な生産を試みた。

【方法・結果】　真菌のエルゴチオネイン生合成経路では、まず、ヒスチジンがトリメチル化されてヘルシニンになり、次いで、ヘルシニンとシステインからヘルシニルシステインスルホキシドが生成する。麹菌 *Aspergillus sojae* において、この 2 段階の反応を担う 2 種の酵素の融合タンパク質をコードすると予測される遺伝子を *egtA* とした。次の段階でヘルシニルシステインスルホキシドからエルゴチオネインが生成するが、この反応を担うシステインデスルフラーゼの候補遺伝子として 2 個を選び、*egtB*、*egtC* とした。*A. sojae* においてこれら 3 個の遺伝子を *tef* プロモーターを用いて個別に強制発現させて液体培養を行ったところ、*egtA* の強制発現においてエルゴチオネインの生産量が顕著に増えたのに対し、*egtB* または *egtC* の強制発現では増えなかった。これらの結果から、*A. sojae* では *egtA* の産物が担う反応が律速になっている可能性が考えられる。同様に、*A. oryzae* の *egtA* を *A. oryzae* で強制発現させたところ、エルゴチオネインの生産量が顕著に増えた。

次に、セレン源として亜セレン酸やセレノシスチンを添加して *A. sojae* や *A. oryzae* の *egtA* 強制発現株を液体培養したところ、いずれもセレノネインの生産が確認された。

麹菌の大量培養は容易であることから、今回の知見により、エルゴチオネインやセレノネインの安定かつ高効率な工業生産が期待される。

ergothioneine, selenoneine, *Aspergillus sojae*

講演番号：2A07p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A07 会場

豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β-グルコシダーゼの解明
Identification of ß-glucosidases from *miso koji* mold, *Aspergillus oryzae*, producing isoflavone aglycones in fermented soybean paste

○小野 奈津子[1]、安田（吉野） 庄子[1]、北本 則行[2] ([1]あいち産科技総セ・食工技セ、[2]至学館大・健康科学)
○ Natsuko ONO[1], Shoko YOSHINO-YASUDA[1], Noriyuki KITAMOTO[2] ([1]Food Res. Center, Aichi-Inst, [2]Shigakkan Univ.)

【目的】大豆や大豆加工食品に含まれるイソフラボン類は、エストロゲン様作用、骨粗しょう症予防作用、抗酸化作用および抗ガン作用などの生理活性を示す成分として非常に注目されている。味噌・醤油・テンペ等の大豆発酵食品においては、原料大豆のイソフラボン配糖体（グリコシド）の一部または全部が β-グルコシダーゼによって糖が外され、ダイゼインやゲニステインなどのアグリコンに変換されている。変換されたアグリコンは元のグリコシドよりも顕著に高い生理活性を示すことが知られている。愛知県を中心に生産されている豆味噌（八丁みそ・三州みそ・名古屋みそ等）では原料大豆由来のイソフラボングリコシドのほぼ 100%がアグリコンに変換されている。この高い変換率は、麹菌 *Aspergillus oryzae* が大豆を基質として培養された際に産生する複数の β-グルコシダーゼに起因すると考えられるが、詳細は明らかではない。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて、豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β-グルコシダーゼの解明を試みた。
【方法および結果】麹菌ゲノム情報より推定される 26 個の β-グルコシダーゼ遺伝子のうち、10 個を候補遺伝子として選出した。味噌用麹菌の高頻度相同組換え宿主 *A. oryzae* KBN630-P17 L90 株（*pyrG*$^-$, *ligD*$^-$）を用いて、候補遺伝子の破壊株をそれぞれ作製した。遺伝子破壊株を用いてフラスコスケールの豆麹を作製し、豆麹中の β-グルコシダーゼ活性および α-アミラーゼ活性を測定した。その結果、*AoCel3A* 遺伝子と命名した遺伝子の破壊株において、β-グルコシダーゼ活性が親株と比較して約 15%に低下した。他の 9 個の候補遺伝子破壊株では β-グルコシダーゼ活性がほとんど低下しなかった。α-アミラーゼ活性は、全ての破壊株で親株と同等の値を示した。次に、豆麹中のイソフラボンアグリコンを定量した結果、*AoCel3A* 遺伝子破壊株では、ダイゼイン量が親株と比較して約 70%に低下し、ゲニステイン量が約 60%に低下した。この結果から、*AoCel3A* 遺伝子産物は、豆味噌における大豆イソフラボンアグリコン生成に寄与する β-グルコシダーゼの一つであることが示唆された。（本研究は公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団平成 28 年度研究助成事業により行った。）

Aspergillus oryzae, isoflavone, fermented soybean paste

発表責任者：小野奈津子（natsuko_ono@pref.aichi.lg.jp）

講演番号：2A07p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A07 会場

製麹期間中の麹の乾燥が破精形成に及ぼす影響

Influence of *koji* drying during *koji* making on *haze* formation

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】　清酒の製造工程管理や品質は麹の品質に大きく左右されることから、清酒製造工程のうち製麹が重要視されている。清酒製造現場では、麹菌が蒸米に増殖して白く見える現象である破精が麹の品質判断基準の 1 つとなっている。破精は米表面に菌糸が伸びる破精回りと米の内部に菌糸が入り込む破精込みの 2 つに分けられる。一般的に破精込みは、加水分解酵素の生産やその酵素バランスに影響すると言われており、製造現場では製麹後半に麹の水分を積極的に低下させ破精込みを進行させている。破精の評価法として研究レベルでは、麹粒を外側から削りその部分の菌体量測定で判断する方法や、光学顕微鏡や電子顕微鏡での観察から破精部分を判断する方法が報告されている。しかし製造現場ではリアルタイムの判断が求められることから、目視による大まかな確認が行われているのみで、品質評価指標としては科学的根拠に乏しい。我々は、破精回りと破精込みを区別して数値化し、製麹の品質評価指標として利用できる破精の簡便な定量的評価法を確立した。本研究では、製造現場で行われている製麹後半に乾燥させる経過をたどる試験製麹を行い、麹の乾燥が破精形成に及ぼす影響を調べた。

【方法】　精米歩合 60%の雄町 200g を基質とし、蒸し上げ後水分含量約 32wt%になるよう調製した。これに清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 株の胞子懸濁液を混ぜ込み、均一な培養状態の維持と培養期間中の制御が可能な無通風箱培養法で試験製麹を行った。製麹は、30℃, 95%RH 環境下で 24 時間、その後 12 時間かけて 40℃まで上昇させ、さらに 40℃で 12 時間、計 48 時間の製麹経過をベースとした。製麹後半の乾燥は、開始から 36 時間後から温度はそのままで相対湿度を低下させる経過と、30 時間後から低下させる経過の 2 パターンで製麹を行った。それぞれ一定時間ごとの麹の破精の評価をデジタルマイクロスコープにより行い、菌体量及び酵素力価を併せて測定した。

【結果】　製麹期間中に相対湿度を低下させることで、麹の水分量及び水分活性が低下する経過となり、麹が乾燥していることを確認した。ベースとする経過と乾燥させる経過において、破精回りは大きな違いは見られなかったが、破精込みは乾燥させる経過のほうが増加していた。これは製造現場で言われている認識と一致する。このとき菌体量は若干の低下が見られたが、酵素力価にはあまり変化が見られなかった。

koji making test, *koji* drying, internal *haze*

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：2A07p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A07 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の接合型と表現型の関連
Relationship between mating type and phenotype of *koji* mold *Aspergillus oryzae*
○小高 敦史、森本（榊原） 舞子、松村 憲吾、秦 洋二（月桂冠・総研）
○Atsushi KOTAKA, Maiko MORIMOTO-SAKAKIBARA, Kengo MATSUMURA, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

【目的】清酒醸造に用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* は接合型遺伝子を有するが、有性世代は確認されていない。また、接合型と表現型の関係はよくわかっていない。そこでまず、麹菌の接合型と酵素活性との関連を評価することにした。
【方法】麹菌は、清酒用、醤油用、味噌用などの市販種麹を用いた。米麹は、精米歩合 70%の白米を用いてシャーレにて製麹した他、醸造現場から一部サンプリングすることによって得た。国税庁所定分析法に準じて米麹より酵素抽出し、糖化力、α-アミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）を測定した。種麹に含まれる麹菌の接合型は、*MAT1-1*, *MAT1-2* の全長を増幅させるプライマーを用いて PCR にて判定した。種麹、米麹に含まれる麹菌の接合型の割合は、*MAT1-1*, *MAT1-2* の一部を増幅させるプライマーを用いて qPCR にて評価した。
【結果】市販種麹 58 種について接合型を調べたところ、*MAT1-1* のみ、*MAT1-2* のみ、および両方の接合型が含まれるものがあったが、接合型と用途との関連は見出せなかった。また、米麹にした場合は、接合型と糖化力との相関が非常に高く、接合型とα-アミラーゼとの相関も比較的高く、接合型と ACP との相関はみられなかった。一方、*MAT1-1*, *MAT1-2* の両方の接合型を含む種麹で製麹した場合は、*MAT1-1* の割合は製麹過程で減少する傾向にあり、米麹に含まれる各接合型の割合と糖化力には関連がみられた。現在、接合型と酵素活性以外の形質との関連や、接合型遺伝子が酵素活性に及ぼす影響を解析中である。

Aspergillus oryzae, mating type, rice *koji*

発表責任者：小高　敦史（a_kotaka@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2A07p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A07 会場

全ゲノム情報を用いた泡盛黒麹菌を含む *Apergillus luchuensis* の系統解析

Phylogenetic analysis of *Apergillus luchuensis* strains including Awamori black koji mold based on whole genome analysis

○塚原 正俊[1]、阿部 峻之[1]、東 春奈[1]、外山 博英[2]、水谷 治[2]、山田 修[3]([1]株式会社 バイオジェット、[2]琉球大学農学部、[3]独立行政法人 酒類総合研究所)
○Masatoshi TSUKAHARA[1], Takayuki ABE[1], Haruna AZUMA[1], Hirohide TOYAMA[2], Osamu MIZUTANI[2], Osamu YAMADA[3] ([1]BioJet Co. Ltd., [2]Faculty of Aguriculture. University of the Ryukyus, [3]National Research Institute of Brewing)

黒麹菌は、沖縄県の伝統的酒類である「泡盛」の醸造に用いられてきた微生物で、黄麹菌と共に国菌として認定されている。黒麹菌はその特徴として、黒色の分生子形成、高い糖化力、高いクエン酸生産能を有する。この黒麹菌を含む黒アスペルギルスの分類については、形態を中心とした解析から様々な提案がなされてきたものの混乱した期間が長く続いていた。近年、複数の遺伝子配列を対象とした系統解析により、黒麹菌は独立した種であることを確認し *Aspergillus luchuensis* として再定義することができた[1)]。一方、沖縄県での一般的な泡盛醸造は異なる黒麹菌株を混合した複菌麹が用いられており、個々の株が異なる特性を有することが経験的に知られると共に、それぞれの株の特性を効果的に活用している。また、泡盛醸造における中心的な役割を担う *A. luchuensis* の進化の系譜を明らかにすることは、沖縄県の歴史や文化を理解する上で大きな意義がある。以上のことから、本研究では複数の *A. luchuensis* およびその近縁種を対象として全ゲノム情報を用いた詳細な系統解析を行った。

解析対象の菌株として、琉球大学に保存されている沖縄由来の株（酒造所あるいは自然環境から採取）および公共機関・研究所の供託菌株を用いた。各株のゲノム情報を次世代シーケンサーMiseq により取得し、*A. luchuensis* NBRC4314 をリファレンス配列とした比較により得られた変異情報を用いて系統解析を行った。その結果、解析に供した黒アスペルギルス全体は、大きく 3 つの群 *A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* に分かれ、従来法との整合性が確認された。さらに、今回の手法によりそれぞれの種間の詳細な距離や種内の相互関係など詳細な情報が得られることがわかった。一方、*A. luchuensis* の種内の系統解析結果から、*A. luchuensis* は大別して 2 グループに分かれること、およびこれらのグループの分岐は約 400 年前と推定された。今回の解析結果から総合的に考えると、①*A. luchuensis* に含まれる明確な海外由来株はこれまでの解析では確認できない、②沖縄では、*A. niger*、*A. tubingensis*、*A. luchuensis* の全ての種が見出された、③*A. luchuensis* の系統分化は数百年間の期間で起きていると推察され泡盛醸造の史実である 600 年以上の歴史と符合する、④*A. luchuensis* のそれぞれのグループの祖先に近い位置からは、古い時代に泡盛酒造所より採取された株が分岐していた、という複数の理由から、*A. luchuensis* は沖縄県由来の微生物であり、泡盛醸造に利用され続ける中で種内の分化が進んだと考えられた。

１） 山田修：醸協，110，64-67（2015）

Black koji mold, Awamori, Genome

発表責任者：塚原正俊（tsuka@biojet.jp）

講演番号：2A07p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A07 会場

Aspergillus luchuensis 由来フェノール酸脱炭酸酵素の米ぬか中に含まれる誘導物質の探索
Substances in rice bran inducing phenolic acid decarboxylase of *Aspergillus luchuensis*
○眞榮田 麻友美[1]、渡嘉敷 正司[2]、渡嘉敷 みどり[2]、上地 敬子[1]、伊藤 進[1]、平良 東紀[1]([1]琉大農、[2]石川種麹店)
○Mayumi MAEDA[1], Masashi TOKASHIKI[2], Midori TOKASHIKI[2], Keiko UECHI[1], Susumu ITO[1], Toki TAIRA[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Ishikawatanekojiten)

【目的】泡盛古酒の特徴香として知られているバニリンは，原料米中のフェルラ酸（FA）が醸造中に酵素的に 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によってバニリンに変わることが知られている。泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換は，酵母または乳酸菌などのフェノール酸脱炭酸酵素（PAD）によるものだと考えられてきた。一方，*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* のゲノム上に, 細菌および *Candida* 属と相同性を有する配列が存在する。我々はこれまでに, *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株（以下，*A. luchuensis* ISH1）由来フェノール酸脱炭酸酵素（AlPAD）が FA から 4-VG への変換を触媒すること，AlPAD が製麹中に発現・機能していることを明らかにしている。本研究では，*A. luchuensis* の FA を 4-VG へ変換する活性（FAD 活性）の米成分による誘導性と AlPAD の誘導物質の探索を行った。

【方法】有限会社石川種麹店より分与していただいた *A. luchuensis* ISH1 を供試菌株として用いた。誘導実験は最小培地に米ぬかと米粉，およびそれらの構成成分である FA，グルコース，キシロースおよびアラビノースまたはそれらの各種混合物を添加した培地で培養した菌体を用いて静止菌体反応による FAD 活性を調べた。誘導物質の探索は，米ぬかに水を添加し 121°C，15 分オートクレーブして得られる液部（熱水抽出物）を用いて行った。米ぬか熱水抽出物を限外ろ過（10,000 cut off）に供し，ろ液である低分子画分を各種クロマトグラフィーに順次供し，誘導物質の探索を行った。誘導物質含有画分の同定は，得られた画分を用いて *A. luchuensis* ISH1 を培養し，静止菌体反応による FAD 活性を調べた。

【結果】誘導実験の結果，FAD 活性は 1%米ぬか添加区で最も高く，1 mM FA 添加区は米ぬか添加区の 1/3 程度，米粉，グルコース，キシロース，アラビノース（各 1%）添加区ではほとんど検出されなかった。米ぬかの熱水抽出物を限外ろ過に供した結果，分子量 10,000 以下の画分に誘導性が認められた。本画分を DIAION HP20 および Hi-Flash column ODS-L カラムに供した結果，非吸着画分に誘導性が認められた。それらの活性画分を TSKgel Amide-80 に供した結果，複数の画分で誘導活性が認められた。これらのことから，分子量が小さく極性の高い誘導物質が複数あることが示唆された。活性画分に含まれる成分の分析を行ったところ，グルコースを構成糖とするオリゴ糖が検出された。

Aspergillus luchuensis, phenolic acid decarboxylase, Awamori

発表責任者：平良東紀（tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2A07p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A07 会場

速醸酛及び山廃酛を用いた清酒醸造過程における細菌叢と真菌叢の経時的変化

Bacterial and fungal flora of sake koji, sokujo-moto, yamahai-moto and main mashes

○佐藤 万里、三枝 静江、細井 知弘（東京都立食技セ）
○Mari SATO, Shizue SAEGUSA, Tomohiro HOSOI (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【背景・目的】

清酒製造時の麹菌・清酒酵母以外の微生物の存在は，製品の品質に影響を及ぼし得る。近年，次世代 DNA シークエンサーを用いた解析により，種々の清酒に関して，各醸造工程の詳細な菌叢が明らかとなってきている。我々はこれまでに，速醸酛造りの麹・酒母・もろみに数十種類の細菌が存在して醸造過程で変動すること，また，製造場・製造ロットにより細菌叢が異なることを明らかにしてきた（農芸化学会 2014・2015 年度大会 にて発表)。本大会では，速醸酛造りの真菌叢，及び生酛造り（山廃仕込み）の細菌叢・真菌叢の経時的変化に関する解析結果を報告する。

【方法】

試料として,都内清酒製造場より提供を受けた各醸造過程の凍結試料(速醸酛造り 4 製造ロット分，生酛造り 1 製造ロット分）を用いた。麹，酒母，もろみの各試料からゲノム DNA を抽出し（QIAamp DNA Stool, ビーズ破砕処理併用),細菌叢の解析用に 16S rRNA 遺伝子の V7-V9 領域(position 968-1390)の PCR 増幅産物を，真菌叢の解析用に ITS（internal transcribed spacers）領域（ITS86-ITS4）の PCR 増幅産物を調製して，Roche GS Junior によりシークエンシングを行った。得られたリードについて，相同性検索を行い，各試料の菌叢構成を解析した。

【結果・考察】

解析の結果，酒母・もろみには，麹菌・清酒酵母以外にも，速醸酛造り・生酛造りそれぞれに特徴的と思われる細菌叢および真菌叢が存在することが明らかとなり，それらの微生物叢は，醸造過程で経時的に変化していた。また，微生物叢とその変化様式は，製造場・製造ロットにより異なっていた。

このような微生物叢の違いにより酒質の差異が生じると考えており，麹菌・清酒酵母以外の種々の共存微生物が清酒の品質に与える影響について，さらに解析を進めていく予定である。

sake koji and mash microflora, sokujo-moto and yamahai-moto, *A. oryzae* and *S. cerevisiae*

講演番号：2A07p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A07 会場

麹脂質の腸内細菌による代謝分解物質の解析

Koji lipid metabolites produced by intestinal microbial flora

○藤川 彩美、阪本 真由子、許 志豪、北垣 浩志 (佐賀大院農)
○Ayami FUJIKAWA, Mayuko SAKAMOTO, Shigo KYO, Hiroshi KITAGAKI (Saga Univ.)

【背景・目的】

和食の健康効果は和食の栄養成分だけでなく、その腸内細菌との相互作用によってももたらされていると考えられる。例えば、和食が腸内細菌叢のバランス維持に寄与し、これが肥満抑制や大腸ガンのリスク軽減につながるということが最近の研究で明らかとなっている。

麹は古くから多くの日本の発酵食品で糖化剤として使われており、和食の基盤であると言える。このことから現在も日本人は定常的に麹を食べているが、その腸管内での代謝・分解物の報告はほとんどない。日本人の平均寿命の長さを考えると麹代謝物、麹分解物が腸管で生成し、なんらかの役割を果たしていることが考えられる。特に麹の脂質成分の報告は少なく、その腸管内の代謝物、分解物に至っては知見がまったくない状態である。

そこで、本研究では、腸管における麹脂質の代謝物、分解物の情報を得るために、腸内細菌による麹脂質の代謝や代謝産物の機能性を解明することを目的とした。

【実験方法】

腸管内での麹の分解をシミュレーションするために、マウス・イヌ・ウシの糞便から採取した腸内細菌を分離しておよそ 10^6cells/ml にまで増やし、粉砕した白麹を添加した GAM 培地にて 35℃の嫌気条件下で 48 時間培養した。クロロホルム・メタノール溶液で培養物から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いて脂質画分を解析した。

【結果・考察】

TLC 解析の結果、マウス・イヌ・ウシいずれの腸内細菌においても白麹を添加して培養したサンプルで代謝物と考えられる新たなバンドが Rf 値＝0.63、0.8 付近に確認された。この結果から、腸内細菌により麹由来の何らかの成分が代謝されて脂質分解物が生産されていると考えられた。こうした分子種は腸管内で実際に生成し、他の腸内細菌に影響を与えたり腸管上皮細胞に吸収されたりして、なんらかの健康効果を持つ可能性がある。本大会では、黄麹の脂質分解物や白麹・黄麹脂質分解産物の構造に関する情報も併せて報告し、麹を食べる意義についても考察したい。

Koji, intestinal microbial flora, lipid

発表責任者：北垣　浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2A07p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A07 会場

高糖野菜発酵液の発酵過程における細菌叢解析
Analysis of bacterial community in the fermentation process of concentrated sugar-vegetable fermented beverage
○邱 泰瑛[1]、須田 亙[2,3]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2,4]、高橋 知也[5]([1]北見工大、[2]東京大院新領域、[3]慶応大医、[4]早大先進理工、[5]アルソア R&D)
○Tai-Ying Chiou[1], Wataru Suda[2,3], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2,4], Tomoya Takahashi[5]([1]Kitami Tech., [2]Tokyo Univ., [3]Keio Univ., [4]Waseda Univ., [5]ARSOA・R&D)

【目的】砂糖と野菜を発酵させて作った飲料は「酵素液」と呼ばれ、発酵食品として知られている。自然発酵の場合、酵素液には様々な食材を使用するため、細菌叢の多様性を持っている。しかしながら、酵素液の発酵過程は乱れなく、製品になるまで品質が安定している。発酵過程中の高糖液（50% w/w）による高浸透圧の環境と細菌叢が生成した有機酸による pH 値の低下はその安定理由だと推測される。そこで発酵過程における細菌叢の変動を解明するため、本研究では、次世代シーケンサーを利用し、酵素液の発酵時間に伴う細菌叢の変化を解析した。
【方法】酵素液の原料として 12 種類の葉菜類、7 種類の根菜類、3 種類のキノコ、3 種類の糖類を使用した。原料の総重量 1.7 トンであり、その内 50% (w/w)を糖類が占めた。すべての原料は無農薬で栽培されたものである。野菜とキノコは水洗したあとすぐに仕込んだため、その表面に付着した微生物はそのまま自然発酵に利用された。原料を滅菌済みの発酵槽に入れ、25℃で自然発酵させた。初日から 10 日目までに計 4 回のサンプリングをした。サンプリングする前によく攪拌し、採取したサンプルの pH と ºBx 値を測定し、DNA の抽出を行うまで-20℃で保存した。細菌叢の 16S rRNA の V1-V2 領域を増幅するためプライマー27Fmod と 338R を使用した。次世代シーケンサー（454 GS FLX Titanium または 454 GS Junior）を用いて、細菌叢に対して網羅的な分析を行った。UCLUST プログラムを用いて OTUs を計算した。データバンク NCBI を利用し、BLAST で配列を検索した。系統樹とヒートマップを作成する際にはソフトウェア MEGA6 と iTOL を用いた。発酵時間の影響を検討するため主座標分析(PCoA)を行った。
【結果】初日から3日目までpHの変化は僅か0.3だったが、7日目に入ると約1.3低下し、pH 4.0となった。ºBxでは初日から3日目まで約3ºBx低下し、49ºBxとなった。初日のOTUsは100を超えたが、3日目に入ると20前後となり、その後あまり変化は見られなかった。Proteobacteria門は初日48.6-62.7%を占めたが、3日目に入るとほとんど消えてしまった。一方、Firmicutes門は3日目に入ると94.9-99.7%を占め、優勢となった。すべてのサンプルから78属の細菌を検知した。その内55属は初日の酵素液の中でしか探知できなかった。また、3日目の酵素液には、*Lactobacillus*属と*Leuconostoc*属の菌叢はそれぞれおよそ6割と4割を占めた。7日目になると*Lactobacillus*属は8-9割を占めた。系統樹付きのヒートマップの結果によると、7日目の酵素液に乳酸菌の一種である未知菌（*Undefined 1*）が優勢菌となり、50%以上を占めた。主座標分析の結果によると、初日から7日目まで酵素液の菌叢に大きな変化を示した。

sugar-vegetable fermented beverage, spontaneous fermentation, bacterial community

発表責任者：邱泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2A07p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A07 会場

コリネ型細菌における長鎖脂肪酸アシル CoA の脱 CoA 化酵素の特定
Identification of a long-chain acyl-CoA thioesterase in *Corynebacterium glutamicum*
○井元 瞭介[1]、川上 春佳[1]、加藤 崚介[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
○Ryosuke IMOTO[1], Haruka KAWAKAMI[1], Ryosuke KATO[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 コリネ菌では、大腸菌と異なり、脂肪酸生合成の脱調節だけでオレイン酸（C18）等の長鎖脂肪酸の分泌が起こる（既報）。これはコリネ菌がアシル CoA の分解代謝系（β 酸化経路）を持たないためであり、過剰合成されたアシル CoA は脱 CoA 化されて遊離脂肪酸になり、細胞外に排出されるものと考えられる。通常、脱 CoA 化はチオエステラーゼ（Tes）によって担われるが、本菌種のゲノムには Tes 様遺伝子が少なくとも 5 種存在する。その内のどれが長鎖の脱 CoA 化反応に関わっているかはわかっていない。本研究では、その特定を試みた。

【方法と結果】 目的遺伝子は脂肪酸を生産する細胞で誘導発現している可能性がある。そこで、まず、野生株と脂肪酸生産菌（*fasR* 欠損株）の 2 者間での発現量解析を試みた。しかし、候補遺伝子の中に、そのような誘導型遺伝子は見いだされなかった。従って、目的遺伝子は構成発現していると考えられた。一方、目的遺伝子は、もし、脂肪酸生産菌でそれが欠損すれば、脂肪酸生産能が損なわれるはずである。実際、*tesA* と命名した 1 遺伝子は、その通りの表現型を示した。生産菌において、同遺伝子の発現をイノシトール誘導型にすると、脂肪酸生産はイノシトール依存性を示した。さらに、生産菌で同遺伝子を増幅させると、脂肪酸生産量は有意に向上した。以上から、本菌種による長鎖脂肪酸生産には *tesA* が関わっていること、そして、同機能が脂肪酸生産の律速になっていることが示された。因みに、大腸菌では、Tes の欠損による生育への影響はないと報告されている。コリネ菌野生株で *tesA* を破壊すると、生育が悪化し、この生育悪化は Tween 80（オレイン酸系サーファクタント）で回復することがわかった。なぜコリネ菌は *tesA* を欠損すると遊離オレイン酸を要求するようになるのか。そのメカニズムについても考察する。

Corynebacterium glutamicum, long-chain acyl-CoA thioesterase, fatty acid production

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A07 会場

コリネ型細菌における長鎖脂肪酸 CoA 化酵素の特定
Identification of long-chain acyl-CoA synthetases in *Corynebacterium glutamicum*
○高橋 敬祐[1]、井元 瞭介[1]、川上 春佳[1]、加藤 崚介[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
○Keisuke TAKAHASHI[1], Ryosuke IMOTO[1], Haruka KAWAKAMI[1], Ryosuke KATO[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 前演題のチオエステラーゼ（Tes）反応により生じた遊離脂肪酸は、脂肪酸アシル CoA シンセターゼ（FadD）と呼ばれる逆反応で再び、アシル CoA に戻ることができるため、Tes 同様、FadD も脂肪酸生産に少なからず関わっている可能性がある。本菌種のゲノムには FadD 様遺伝子が少なくとも 5 種存在するが、それらの基質は一切わかっていない。本研究では、その内のどれが長鎖脂肪酸の CoA 化に関わっているかを解析した。

【方法と結果】 目的とする機能は、生成した遊離脂肪酸をアシル CoA に戻すので、脂肪酸生産に不利になると予想される。従って、脂肪酸生産菌で高発現させたとき、力価の低下を招けば、それが目的遺伝子と考えられる。候補遺伝子の中から 2 遺伝子（*fadD5* および *fadD15* ）がそのような遺伝子として選択された。野生株はビオチンフリーでも Tween 80（オレイン酸系サーファクタント）が存在すれば生育できるが、その生育能は *fadD5* の破壊で低下した。*fadD15* の場合も、その破壊により生育能がやや低下した。従って、*fadD5* はオレイン酸の CoA 化を担い、*fadD15* も弱いながら、その活性を有していると考えられる。一方、コリネ菌野生株は Tween 40（パルミチン酸系サーファクタント）が存在すると、CoA 化を受けて生じたパルミトイル CoA が脂肪酸生合成をフィードバック調節するため生育できなくなることが知られているが、この Tween 40 感受性は *fadD15* の破壊で低下した。従って、*fadD15* は主にパルミチン酸の CoA 化に関わると推察された。野生株で *fadD5* または *fadD15* を破壊すると、脂肪酸生合成系が野生型であるにもかかわらず、遊離脂肪酸の分泌が起こることを見出した。*fadD5* の破壊株が生成する脂肪酸はオレイン酸が主体であるのに対し、*fadD15* の破壊株ではパルミチン酸が主体となっていた。その脂肪酸組成は、*fadD5* が主にオレイン酸の CoA 化を、一方、*fadD15* は主にパルミチン酸の CoA 化を担うとする上記の結論を支持するものである。

Corynebacterium glutamicum, long-chain acyl-CoA synthetase, fatty acid production

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A07 会場

コリネ型細菌における第二の潜在的なデチオビオチン輸送体の探索

A potential dethiobiotin-uptake transporter in *Corynebacterium glutamicum*

○東 佳菜子[1]、中村 絵梨[1]、村田 紀子[1]、堀 一将[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
○Kanako HIGASHI[1], Eri NAKAMURA[1], Noriko MURATA[1], Kazumasa HORI[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 細菌によるビオチンの発酵生産では一般に、生合成経路の最終段階のビオチンシンターゼ反応が律速になっており、このため、前駆体のデチオビオチンが副生する。副生したデチオビオチンを細胞内に回収できれば、ビオチン合成の基質として再利用できると思われるが、デチオビオチンの取り込みを担う輸送体 BioY は、本来、ビオチンの輸送体であるため、本目的には適さない。本研究では、自身のゲノムの中から、デチオビオチンに特異性をもつ取り込み輸送体の探索を試みた。

【方法と結果】 コリネ菌野生株で *bioY* を破壊すると、ビオチンまたはデチオビオチンの要求量が 3 桁高まり，いわゆる高濃度要求形質を示す（既報）。この *bioY*破壊株をデチオビオチン低濃度含有培地に塗布したところ、サプレッサー株が出現することを見出した。これらサプレッサー株ではデチオビオチンの要求量が大きく低下していた。ビオチンの要求量もやや低下するが、その低下幅は小さく、ほぼ狙い通りの表現型を示した。代表株を解析した結果、クレアチニンの輸送を担うと推定される遺伝子が高発現化していることがわかった。この遺伝子を含むプラスミドを *bioY* 破壊株に導入すると、サプレッサー株同様、デチオビオチンの要求量が大きく低下したことから、本遺伝子産物はデチオビオチンの取り込み輸送体としての機能を有すると結論した。コリネ菌から育種したビオチン生産菌で同遺伝子を発現させると、ビオチンの生産量が増加した。従って、狙いとする仕組みが成立しているものと考えられる。

Corynebacterium glutamicum, dethiobiotin uptake, biotin synthesis

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A07 会場

酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り替え
Metabolic pathway switching by oxygen level for production of 1,5-diaminopentane and succinic acid in a single *Corynebacterium glutamicum* strain

小林 俊介[1]、岩崎 還帰[1]、川口 秀夫[2]、仁宮 一章[1,3]、荻野 千秋[4]、高橋 憲司[1]、近藤 昭彦[2]、○柘植 陽太[1,3] ([1]金沢大理工、[2]神戸大院イノベ、[3]金沢大新学術、[4]神戸大院工)
Shunsuke KOBAYASHI[1], Genki IWASAKI[1], Hideo KAWAGUCHI[2], Kazuaki NINOMIYA[1,3], Chiaki OGINO[4], Kenji TAKAHASHI[1], Akihiko KONDO[2], ○Yota TSUGE[1,3] ([1]Natural System, Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]InFiniti, Kanazawa Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【背景・目的】近年、地球温暖化等の問題から、植物を原料に微生物を用いてプラスチックやナイロンなどの樹脂原料を生産する研究が進んでいる。コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）はグルタミン酸やリジンなどのアミノ酸の生産菌として利用されている通性嫌気性細菌である。本菌は大腸菌由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子（*ldcC*）を導入することにより、好気条件下でリジンから 1 ステップでジアミンのカダベリンを生産する。また本菌は嫌気条件下では、増殖は停止するが代謝活性は維持され、乳酸とコハク酸を生産する。カダベリンとコハク酸はポリアミドや生分解性ポリエステルなどの樹脂原料として利用価値が高いが、現在は別々の条件、菌株で生産されている。特にコハク酸生産においては、はじめに好気条件下において細胞増殖が必要である点から非効率的であった。そこで本研究では、酸素をスイッチとして用いることで中央代謝経路の切り替えを行い、好気条件で細胞増殖とともにカダベリンを、嫌気条件下でコハク酸を高生産する菌株を作製し、同一菌株を用いた二つの樹脂原料の個別生産について検証した。
【方法と結果】親株として *C. glutamicum* ATCC13032 株を用い、初めにコハク酸生産の際の副生成物である乳酸と酢酸の生合成遺伝子（*ldhA*, *pta*, *ack*, *cat*, *pqo*）を欠損させた。リジンのフィードバック阻害解除のため、アスパルトキナーゼ遺伝子（*lysC*）に一塩基変異を導入とともに、*ldcC* 遺伝子を導入した。また、カダベリン、コハク酸双方の生産性向上のため、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（*pyc*）に一塩基置換を導入すると共に高発現してカダベリン・コハク酸高生産株を作製した。作製した株は好気条件下で 218 mg/L（14 h）のカダベリンを、嫌気条件下で 18.2 g/L（10 h）のコハク酸を生産した。1 分子のカダベリンを合成するためには 4 分子の NADPH が必要である。NADPH は主にペントースリン酸経路（PPP）で合成されるため、好気条件下ではグルコース由来の炭素をより多く PPP に流したい。そこで、解糖系と PPP の分岐点であるグルコース-6-リン酸を基質とするグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子（*pgi*）のプロモーターを嫌気条件下で発現誘導する *ldhA* 遺伝子のプロモーターに置換した（P*ldhA-pgi*）。その結果、カダベリン生産量は約 4.7 倍の 1020 mg/L まで向上した。一方、コハク酸生産量は約 24%減少し、13.9 g/L になった。そこで P*ldhA-pgi* カセットをもう一コピーゲノム内に導入したところ、コハク酸生産量は回復した。一方、好気条件ではカダベリン生産量が 737 mg/L まで減少したが、親株よりは約 3.4 倍高い値を保った。本研究の酸素レベルに応じて代謝経路を切り替えるシステムは他の化合物の生産においても利用できると考えられる。

Corynebacterium glutamicum, metabolic switch, metabolic engineering

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：2A07p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A07 会場

コリネ型細菌は増殖できない温度下で乳酸・コハク酸を高生産する
Thermotolerance of *Corynebacterium glutamicum* on production of lactate and succinate under anaerobic conditions

○水野 光[1]、豊田 晃一[2]、仁宮 一章[1,3]、乾 将行[2]、近藤 昭彦[4]、高橋 憲司[1]、柘植 陽太[1,3]([1]金沢大院・自科、[2]RITE、[3]金沢大・新学術、[4]神戸大院・イノベ)
○ Hikaru MIZUNO[1], Koichi TOYODA[2], Kazuaki NINOMIYA[1,3], Masayuki INUI[2], Akihiko KONDO[4], Kenji TAKAHASHI[1], Yota TSUGE[1,3] ([1]Natural System, Kanazawa Univ., [2]RITE, [3]InFiniti, Kanazawa Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov. Kobe Univ.)

【背景・目的】コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）はアミノ酸生産菌として工業的に広く利用されている有用細菌である。本菌を嫌気条件下で培養すると、増殖は停止するが代謝活性は維持され、著量の乳酸と少量のコハク酸を生産する。乳酸やコハク酸は生分解性プラスチックやポリエステル樹脂の原料として利用価値が高く、本菌に代謝工学的改変を施すことにより、乳酸やコハク酸を高生産させる研究が報告されている。コリネ型細菌の増殖至適温度は 30℃ であり 40℃ を超えると増殖は著しく阻害される。これまで嫌気条件下における有機酸生産も、慣例的に増殖至適温度で反応が行われてきたが、生産における最適温度は不明である。本研究では野生株（乳酸生産株）と代謝改変を施したコハク酸生産株を用いて、乳酸・コハク酸生産における温度の影響について検証した。
【方法】乳酸生産株としてコリネ型細菌の野生株（ATCC13032）を用いた。コハク酸生産株としては、副生成物の生合成遺伝子（*ldhA*, *pta*, *ack*, *cat*, *pqo*）を欠損させ、コハク酸への炭素フラックス増加のため Pyruvate carboxylase 遺伝子（*pyc*）をプロモーター置換により高発現した株を用いた。嫌気条件下における有機酸生産は生産温度を 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45℃ にそれぞれ設定して行った。
【結果】野生株における乳酸の単位菌体量当たりの生産速度は、温度の上昇に比例して増加した。42.5℃ での生産速度は 4.67 g/L･h･g-cdw であり、30℃ と比較して 69%増加した。また、コハク酸生産速度は 35℃ で 0.77 g/L･h･g-cdw となり 30℃ と比較して 22%増加したが、それ以上の温度では減少した。一方、代謝改変株を用いたコハク酸生産は野生株とは異なる挙動を示した。42.5℃ で 2.67 g/L･h･g-cdw と 30℃ と比較して 34%増加した生産速度を示し、それ以外の温度では 30℃ と同程度の生産速度を示した。マイクロアレイを用いてそれぞれの株における 30℃ と 42.5℃ での遺伝子発現量を比較した結果、野生株では 42.5℃ で全遺伝子中、ヒートショック遺伝子群を含む 382 遺伝子の発現量が 2 倍以上増加し、346 遺伝子の発現量が半分以下に低下した。解糖系では Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子（*gapA*）の発現量が 3.1 倍に増加した。一方、代謝改変株では 358 遺伝子の発現量が増加し、456 遺伝子の発現量が低下した。解糖系では Pyruvate kinase 遺伝子（*pyk*）の発現量が 2.2 倍に増加したが、他の 4 遺伝子と TCA 回路内の 1 遺伝子で発現量が低下した。各温度における酵素活性を測定した結果、Glucose-6-phosphate isomerase や Pyruvate kinase、Malate dehydrogenase が温度の上昇とともに活性の顕著な増加が見られた。現在、残りの酵素活性の測定を進めているが、本研究により、嫌気条件下においては増殖至適温度にとらわれない生産温度の選択が可能なことが示された。

Corynebacterium glutamicum, thermotolerance, organic acids

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：2A07p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A07 会場

Corynebacterium glutamicum の Tween 40 によるグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激感受性の解析
Analysis of mechanosensitivity under the induction mechanism of glutamate production using Tween 40 in Corynebacterium glutamicum
○澤田 康之[1]、橋本 賢一[2]、中松 亘[2]、曽我部 正博[3]、川崎 寿[2] ([1]名経大管理栄養、[2]東京電機大工、[3]名大院医)
○Yasuyuki SAWADA[1], Ken'ichi HASHIMOTO[2], Tsuyoshi NAKAMATSU[2], Masahiro SOKABE[3], Hisashi KAWASAKI[2] ([1]Nagoya Univ Economics, [2]Tokyo Denki Univ, [3]Nagoya Univ)

【背景および目的】
工業的なグルタミン酸の生産に用いられているCorynebacterium glutamicumは通常の生育条件では細胞外にグルタミン酸を蓄積することはないが、界面活性剤Tween 40を添加することで生育が抑制され、細胞外にグルタミン酸を蓄積する。Tween 40添加によるグルタミン酸過剰生成条件では菌体の脂肪酸含量が低下していることなどが既に報告されているが、その作用点は未だ明確ではない。近年、この微生物のNCgl1221遺伝子がグルタミン酸の過剰生成に深く関与していることが示された。我々はこれまでの研究で、このNCgl1221遺伝子産物が膜張力に依存して開口するメカノセンシティブチャネルであること、ATPなどのエネルギーを使わず、濃度勾配のみによりグルタミン酸を通過させることを明らかにしてきた。本研究はこれまで明確に示されてこなかったTween 40の作用点を解析し、グルタミン酸過剰生成誘導との関係について検討することを目的とした。

【方法及び結果】
通常の生育条件下での C. glutamicum の脂肪酸（残基）の 95%以上はパルミチン酸とオレイン酸である。Tween 40 添加によるグルタミン酸生産条件では非グルタミン酸生産条件と比較し、オレイン酸含量が約 41%低下し、パルミチン酸とオレイン酸の含量の総量に関しても全体で約 25%減少する結果となった。我々は、Tween 40 添加が引き起こす脂肪酸組成変化ならびに脂肪酸の総量がグルタミン酸過剰生成に及ぼす影響原子・分子レベルで検討するため、グルタミン酸排出担体であるメカノセンシティブチャネルの開口過程の分子動力学シミュレーションを行った。その際、脂肪酸総量を通常の濃度に対して 25%減少させた細胞質膜のモデルならびにその細胞質膜の脂肪酸組成比も変化させた 4 通りのモデルを作成し、脂質膜として利用した。その結果、脂肪酸の総量を減らした脂質膜モデル内のメカノセンシティブチャネルは減らす前の脂質膜内のそれより開口しやすくなる様子を見せた。さらにその開口挙動は、パルミチン酸とオレイン酸の組成比によっても違いが見られ、特にメカノセンシティブチャネルと脂質分子との相互作用エネルギーが安定している組成比の脂質膜内ではより開口しやすくなる事を定量的に考察できた。よって、メカノセンシティブチャネルは脂肪酸総量の少ない脂質膜内においては、脂肪酸自身がチャネルとの相互作用を安定させるような構造変化を誘発し、その結果として膜張力を効率的に受容でき、最終的に開口を導きやすくなったと考えられる。

Corynebacterium glutamicum, glutamate production, mechanosensitivity

発表責任者：澤田　康之（ysawada@nagoya-ku.ac.jp）

講演番号：2A07p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A07 会場

Engineering of *Escherichia coli* to facilitate efficient utilization of isomaltose and panose in industrial glucose feedstock

○Kenji ABE (Ajinomoto Co., Inc.)

Fermentative production of useful compounds, such as alcohols, pharmaceutical ingredients, and organic/amino acids, is conducted worldwide. *Escherichia coli* is one of the most useful bacterium for the production of valuable compounds because *E. coli* cells grow quickly, convert substrates to products rapidly, and are genetically engineered readily.
On the other hand, in the industrial production of useful compounds by fermentation, glucose is one of the most frequently used carbon sources. Industrial glucose feedstock prepared by enzymatic digestion of starch typically contains significant amounts of disaccharides such as maltose and isomaltose, and trisaccharides such as maltotriose and panose. Maltose and maltosaccharides can be utilized in *E. coli* fermentation using industrial glucose feedstock because there is an intrinsic assimilation pathway for these sugars. However, saccharides that contain α-1,6 bonds, such as isomaltose and panose, are still present after fermentation because there is no metabolic pathway for these sugars. To facilitate more efficient utilization of glucose feedstock, we introduced *glvA*, which encodes phospho-α-glucosidase, and *glvC*, which encodes a subunit of the phosphoenolpyruvate-dependent maltose phosphotransferase system (PTS) of *Bacillus subtilis*, into *E. coli*. The heterologous expression of *glvA* and *glvC* conferred upon the recombinant the ability to assimilate isomaltose and panose. The recombinant *E. coli* assimilated not only other disaccharides but also trisaccharides, including alcohol forms of these saccharides, such as isomaltitol. To the best of our knowledge, this is the first report to show the involvement of the microbial PTS in the assimilation of trisaccharides. Furthermore, we demonstrated that an L-lysine-producing *E. coli* harboring *glvA* and *glvC* converted isomaltose and panose to L-lysine efficiently[1]. These findings are expected to be beneficial for industrial fermentation.

1) Abe, K., Kuroda, A. & Takeshita, R. Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101: 2057. https://doi.org/10.1007/s00253-016-8037-z.

Escherichia coli, Isomaltose, *glvAC*

発表責任者：阿部健二（kenji_abe68@ajinomoto.com）

講演番号：2A07p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A07 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸生成能と発酵中間生成物アセトアルデヒドの関係性の検証
Relationship between acetic acid production ability and acetaldehyde accumulation of *Acetobacter pasteurianus*

○藪田 峻也[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、楢崎 暢[1]、山我 幹太[1]、石川 泰平[1]、岸 幹也[2]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大・応生科・醸造、[2]Mizkan Holdings 中研)
○ Takaya YABUTA[1], Morio ISHIKAWA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Toru NARASAKI[1], Kanta YAMAGA[1], Taihei ISHIKAWA[1], Mikiya KISHI[2], Akiko OKAMOTO-KAINUMA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Mizkan Holdings Co., Ltd.)

【目的】酢酸菌は細胞膜上に局在するアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）とアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）によりエタノールから酢酸を生成し、これにより ATP を獲得する（酢酸発酵）。このため、酢酸発酵の際、菌体はエタノールや酢酸の存在下で生育することとなり、これらの物質が菌体に及ぼす影響については種々の報告がある。しかし一方、発酵の中間生成物であるアセトアルデヒドとの関係性については殆ど報告がなく、本化合物が菌体生理や酢酸発酵に及ぼす影響については未知の部分が多い。本研究では、静置発酵による食酢醸造に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* を用い、本菌の酢酸生成能の観点から、菌体とアセトアルデヒドとの関係性について検証を行なった。

【方法および結果・考察】酢酸菌 *A. pasteurianus* N-23 株について、初発エタノール濃度を変化させて酢酸への変換率を検証した結果、エタノール 4%以上で変換率の低下が認められ、培地中のアセトアルデヒド蓄積量の増加および酢酸蓄積量の減少が観察された。*aldh* 遺伝子を破壊したところ、培地中に急速なアセトアルデヒドの蓄積が生じ、ATP 獲得基質であるエタノールが残存しているにもかかわらず、菌体生存率は著しく低下した。親株へのアセトアルデヒド添加試験より、培地中のアルデヒド濃度 1%以上で顕著に生菌数が低下し、これに伴いアセトアルデヒドから酢酸への変換率も減少することが判明した。これらのことから、本菌の酢酸生成能は、菌体外アセトアルデヒドによる菌体死滅率を反映していることが推測され、発酵中に生成する中間生成物であるアセトアルデヒドの蓄積を防ぐことが酢酸発酵能の向上に繋がることが推測された。これを実証するため、*aldh* 発現強度の異なる株を構築し酢酸生成能の比較を行なった結果、5%エタノール添加条件下でのアセトアルデヒド蓄積量は *aldh* 発現量に応じて減少し、それに伴い菌体生存率が増加して最終的な酢酸生成量の増加を生じた。また、*aldh* 高発現株は、親株より良好な酢酸生成能を示し、6%エタノール存在下でもほぼ 100%の酢酸への変換率を示した。以上のことより、本菌の酢酸発酵能は、培地中に蓄積するアセトアルデヒド濃度に大きく影響され、1）蓄積したアセトアルデヒドによる菌体の死滅が発酵継続時間の短縮を招き、これにより最終的な酢酸生成量が減少すること、2）酢酸発酵能は、細胞膜上の ADH と ALDH の活性バランスに起因するアセトアルデヒド処理能力に大きく依存することが明らかとなった。

acetic acid fermentation, acetaldehyde, *Acetobacter pasteurianus*

発表責任者：貝沼(岡本)章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2A07p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A07 会場

好熱性乳酸菌におけるペント―スリン酸回路の新奇バイパスの発見

Discovery of a novel bypass of pentose phosphate cycle in thermophilic lactic acid bacteria

○沼口 真緒[1]、善藤 威史[1]、門多 真理子[2]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1]、園元 謙二[1] ([1]九大院農、[2]武蔵野大環境)
○Mao NUMAGUCHI[1], Takeshi ZENDO[1], Mariko KADOTA[2], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1], Kenji SONOMOTO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Musashino Univ.)

【背景】生分解性プラスチックとして利用されるポリ乳酸の原料である乳酸の需要が高まっている。これまで、乳酸の発酵生産には食糧バイオマスを分解して得られるグルコースが用いられてきたが、食糧供給と競合するため非食糧バイオマスの利用が求められている。しかしながら、非食糧バイオマスを分解して得られるキシロースを資化し、高収率で乳酸を生産することのできる乳酸菌の報告は少ない。本研究室で単離した *Enterococcus faecium* QU 50（以下 QU 50 株）は 50˚C という高温でキシロースを基質としてホモ乳酸発酵を行い高純度 L−乳酸を生産することができる（1)。また、ペントースとヘキソースから成る混合糖を使用してもカタボライト抑制を完全に回避した高効率乳酸生産に成功し、非殺菌・開放系での対糖収率 100%の乳酸発酵を達成している（2)。本研究では QU 50 株のキシロース代謝経路の解明を行った。

【方法および結果】QU 50 株の全ゲノム配列の決定とアノテーションが行われた結果、Transaldolase（Tal）を含むペントースリン酸回路に関与する酵素遺伝子が同定された（3）。しかしながら、ペントースリン酸回路に関与する酵素の活性を測定したところ、QU 50 株には Tal 活性が確認されなかった。一方、近年 *Escherichia coli*（*E. coli*）において Tal を介さないペントースリン酸回路のバイパス（C5P バイパス）が明らかになっており（4）、QU 50 株においても同様の経路の存在が考えられた。そこで、C5P バイパスのみにおいて検出される中間代謝物 Sedoheptulose 1,7-bisphosphate（S1,7-BP）の検出を LC-QMS を用いて試みた。その結果、QU 50 株のキシロース代謝時に S1,7-BP が検出されたことから、QU 50 株は C5P バイパスを有することが示唆された。次に、C5P バイパスを介する酵素である Phosphofructokinase（Pfk）の機能解析を行った。ゲノム解析の結果、QU 50 株は 3 つの *pfk*（*pfk1, pfk2, pfk3*）をもつことが明らかになっており、*tal* および *pfk* を欠損しキシロース資化性を失った *E. coli⊿talAB⊿pfkAB* に QU 50 株の *pfk* をそれぞれ導入した。その結果、*pfk3* を導入した *E. coli⊿talAB⊿pfkAB/pfk3(QU 50)* のキシロース資化性が回復したことから、QU 50 株の Pfk3 は大腸菌の C5P バイパスにおいて機能し、QU 50 株の C5P バイパスへの関与が示唆された。また、*E. coli⊿talAB⊿pfkAB/pfk3(QU 50)* の無細胞抽出液を使用した *in vitro* 反応によって、Pfk3 は本来の基質である Fructose 6-phosphate のみならず、Sedoheptulose 7-phosphate のリン酸化が可能であることが明らかとなった。

1) Abdel-Rahman *et al*., FEMS Microbiol. Lett., **362**, 1-7, 2015; 2) Tan *et al.*, RSC Adv., **7**, 24233-24241, 2017; 3) 阿部清孝ら、日本生物工学会大会 (2015); 4) Nakahigashi *et al*, Mol. Systems Biol., **5**, 306, 2009.

Lactic acid, Pentose phosphate cycle, Xylose

発表責任者：沼口真緒（mao.1108o0@gmail.com）

講演番号：2A07p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A07 会場

乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* AK23 表層タンパク質の LPS 消去メカニズムに関する研究
Mechanisms of Eliminating LPS (lipopolysaccharide) by Surface protein of Lactic Acid Bacteria *Pediococcus pentosaceus* AK23 strain
○浅見 恭子、金内 誠、須田 義人、松本 菜月（宮城大学）
○Kyoko ASAMI, Makoto Kanauchi, Yoshihito Suda, Natsuki Matsumoto (Miyagi Univ.)

【目的】カビや酵母、細菌を利用した発酵食品は、日本の伝統的食文化のひとつでもあり、保存性だけでなく機能性にも優れている。近年では乳酸菌の機能性に注目が集まっており、それに関する研究は、プロバイオティクスの概念のもとに発展を遂げ、様々な疾患と腸内細菌との関係や、それを予防・改善する機能解明が期待されている。ところで、腸内炎症を引き起こす原因物質のひとつに、グラム陰性菌由来の免疫刺激物質 LPS(lipopolysaccharide)がある。LPS は O 抗原とコア多糖から成る糖鎖部位と、リピド A から成る脂質部位で構成されており、LPS の毒活性の中心はリピド A であることが報告されている。これまでに乳酸菌の LPS に対する効果について、*Pediococcus pentosaceus* AK23 株 [1]菌体表層に LPS 消去タンパク質(LEP)が存在することが報告されている [2]。しかし、LEP の LPS に対するクローニングや作用機作の解明には至っていない。そこで、本研究では LPS 消去メカニズムの解明を目的とした。表層タンパク質をクローニングし、反応前後の構造変化を明らかにすることで、その作用機作を明らかにしていくこととした。
【方法】供試菌株 AK23 株表層タンパク質(4,014bp)は、菌体内発現ベクターpNI-His DNA 及びグラム陽性菌 *Brevibacillus* 形質転換体を用いて発現させた。発現させた LEP の LPS 消去率測定には、リムルスカラーKY テストワコー(和光純薬工業)を用いた。また、LEP と LPS の反応前後のリピド A の構造変化を検討するために、NEFA C-テストワコー(和光純薬工業)を用いた比色法により遊離脂肪酸量を測定した。さらに、遊離脂肪酸は GC/MS により定量定性分析を行った。
【結果】LEP 溶液の LPS 消去能測定の結果、未反応の対照の LPS 量を 100%としたところ、48 時間の反応において 76.5%の LPS 消去が確認できた。また、遊離脂肪酸量測定の結果、LPS リピド A の全構成脂肪酸量を 100%としたところ、反応液中の脂肪酸遊離率は 24 時間で 42.8%、48 時間で 67.3%であった。このことから、リピド A から構成脂肪酸が経時的に分解・遊離していることが確認できた。さらに、リピド A の GC/MS の定量定性分析の結果、主構成成分である 3-ヒドロキシミリスチン酸、その他パルミチン酸、ステアリン酸が検出された。LEP 溶液との反応により、各構成脂肪酸は 24～48 時間にかけて経時的に脂肪酸の遊離が確認できた。これらの結果から、LEP 溶液による LPS 消去において、リピド A 構成脂肪酸が分解されたことが明らかとなった。よって、その分解にはリピド A 内のアシル基結合を分解するアシラーゼ活性が関与している可能性が示唆された。
1)Kondo; J Food Sci,81(6),pp1457-1465　2)Asami;J Food Sci,82(7),pp1657-1663(2017)

lactic acid bacteria, lipopolysaccharide, lipid A

講演番号：2A08a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A08 会場

石鎚黒茶の微生物動態に関する研究

Study on microbial dynamics Ishiduchi black tea

○水野 智文[1]、岩橋 均[1]、堀江 祐範[2] ([1]岐阜大応微、[2]産総研)
○Tomofumi MIZUNO[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Masanori Horie[2] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

１．はじめに

乳酸菌は、ヨーグルトやチーズといった発酵食品のほかに飲料水、あめなどの食品や歯磨き粉などの乳酸菌入り商品や錠剤などの医薬品と多岐に渡って利用されている。その乳酸菌を利用した健康食品の１つに後発酵茶というものがある。後発酵茶は、血糖値抑制作用や肝機能向上など機能性食品として近年、注目され始めている。お茶は、栽培方法、摘採時期、製造工程、発酵度合いの違いによって、発酵茶、半発酵茶、不発酵茶、後発酵茶の大きく４つに分類されている。発酵茶、半発酵茶、不発酵茶の発酵は、茶葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼやペルオキシダーゼなどの酸化酵素の働きによってカテキン類であるタンニンの酸化を行う。一方、後発酵茶は、乳酸菌など微生物の働きによって発酵が行われる。日本では、四国が主な生産地で徳島県では阿波晩茶、高知県では碁石茶、愛媛県では石鎚黒茶、富山県ではバタバタ茶が作られている。発酵に関与する微生物に関しては、お茶によって優位となる菌が異なる。しかし、後発酵茶に関する研究はまだあまり行われておらず、どのような種の菌が存在し、発酵に関与しているかなどはわかっていない。そこで、本研究では、日本の後発酵茶の一つである石鎚黒茶を工程ごとに次世代シーケンサーで菌叢解析し、製造工程における微生物の動態を調べることで発酵に関与している菌種の同定を目指した。

２．実験方法

石鎚黒茶の製造工程における茶葉をサンプルとして得た。これらの茶葉サンプルを市販のキット (Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (日鉄住金環境㈱) を用いて DNA を抽出した。得られた DNA は、16S rRNA (バクテリア) および ITS (真菌) のプライマーにより増幅し、次世代シーケンサー (illumina MiSeq) による 16S rRNA メタゲノム解析を行った。得られた塩基配列は、NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) による Local BLAST によって菌種の同定を行った。

３．結果および考察

発酵前の工程では *Arthrospira*、一次発酵後では *Klebsiella*、二次発酵後では *Lactobacillus* が優位になった。*Lactobacillus* が優位になった要因として発酵条件が嫌気性であり、バクテリオシンを出すことによって優位になったのではないかと考えられる。

Post heated and fermented tea, Ishiduchi black tea, NGS

発表責任者：水野智文（w4521083@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A08 会場

鹿児島の壺造り黒酢の醸造に関わる「壺付き酢酸菌」存在の有無に関する検証
Verification on the presence of "pot inhabiting strain of acetic acid bacteria" contributing to the production of the traditional rice pot vinegar.
○窪田 将之[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、兼崎 友[2]、藤田 信之[3]、藤井 暁[4]、長野 正信[4]、貝沼（岡本） 章子[1]([1]東京農大・応生科・醸造、[2]東京農大・ゲノムセ、[3]東京農大・生命・分子微生物、[4]坂元醸造株式会社)
○Masayuki KUBOTA[1], Morio ISHIKAWA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Yu KANESAKI[2], Nobuyuki FUJITA[3], Akira FUJII[4], Masanobu NAGANO[4], Akiko OKAMOTO-KAINUMA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. Agric., [4]Sakamoto Kurozu, Inc.)

【目的】鹿児島県霧島市で生産される鹿児島の壺造り黒酢は、江戸時代より続く伝統的な製法で造られるが、これは陶器製の壺中に麹・蒸し米・水を仕込んでおくだけで自然に原料が酢に変化していくという特殊な製法である。この際、麹に含まれる麹菌以外の微生物は一切添加しないにもかかわらず、自然と壺の中の菌叢が変化し、米の糖化・アルコール発酵・酢酸発酵が連続して進行するが、これらの発酵に関わる微生物の由来に関しては未知の部分が多い。壺酢の酢酸発酵に関わる酢酸菌は、*Acetobacter pasteurianus* であることが報告されており[1)]、多孔質の壺の内壁に棲息していると推測されているが、壺により株にランダムなバリエーションがあるのか、それともメーカー固有の系統の株が存在するのかについては全く不明である。本研究では、坂元醸造（株）の壺酢醸造に関わる酢酸菌についてゲノムレベルでの解析を行ない、所謂メーカー固有の系統である「壺付きの酢酸菌」存在の有無について検証を行なった。
【方法および結果】坂元醸造（株）で仕込みを行なった壺のうち、酢酸発酵期（酸度 2～3%）の壺より菌膜および発酵液を採取し、集積培養を経て酢酸菌の分離を行なった。サンプリングは、壺畑・壺種・仕込み時期（春および秋）の異なる計 8 壺を対象として行なった。分離された酢酸菌は、コロニー性状にバリエーションは観察されたものの、16S rRNA 配列から、いずれも *Acetobacter pasteurianus* と同定された。これらの酢酸菌 19 株についてドラフトゲノム解析を行ない、得られたゲノム情報を基にして 1）SNP 準拠 2）オルソログ準拠 3）全塩基配列間の相同値（dDDH 値）準拠という、原理の異なる三種の方法により系統を解析した結果、全て同様の結果を示し、出現頻度の低い 2 株を除いた 17 株が同一の株を起源とする非常に近い系統関係にあること、また、それらはデータベース上に公開されている *A. pasteurianus* とは異なる系統の株であることが判明した。これにより、同社の壺酢製造においては、醸造過程で種酢や酢酸菌の添加を伴わないにもかかわらず、発酵に関わる酢酸菌は常に同系統であり、壺畑・壺種・仕込み時期にかかわらず、同系統の株（「壺付きの酢酸菌」）が発酵に寄与していることが強く示唆された。これらの株のうち一株について、PacBioRSⅡを用いたコンプリートゲノム解析を行ない、他のゲノム公開株と比較したところ、分離株はゲノムサイズ・CDS 数ともに大きく、このことが同社の製品の特徴と関連していることが示唆された。
1）Haruta *et al.,* Int. J. Food Microbiol. 2006;109:79-87

rice pot vinegar, Acetic acid bacteria, phylogenetic analysis

発表責任者：貝沼（岡本） 章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2A08a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A08 会場

サトウキビ搾汁液から分離した乳酸菌を用いた乳酸発酵黒糖の開発

Development of non-centrifugal brown sugar made from fermented sugarcane juice using lactic acid bacteria isolated from sugarcane juice

○広瀬 直人[1]、前田 剛希[1]、恩田 聡[1]、伊禮 信[1]、和田 浩二[2]([1]沖縄県農研セ、[2]琉球大農)
○Naoto HIROSE[1], Goki MAEDA[1], Satoshi ONDA[1], Shin IREI[1], Koji WADA[2] ([1]Okinawa Pref. Agric. Res. Center, [2]Ryukyu Univ.)

【【背景・目的】黒糖は、サトウキビの搾汁液をそのまま煮詰めて製造する。従って、サトウキビ搾汁液を培地として微生物に有用物質を生産させた後に製糖すると、有用物質を含有した黒糖の製造が可能であると考えられる。しかし、サトウキビ搾汁液には乳酸菌が容易に生育し、粘性物質の生産など黒糖や分みつ糖製造に悪影響を及ぼすことが知られているほか、ショ糖の分解や資化による純糖率（可溶性固形分中のショ糖の割合）の低下も懸念される。黒糖製造はサトウキビ搾汁液の品質、なかでも純糖率に大きく影響され、純糖率が 70%より低い場合には製造が困難となることから、発酵に伴う純糖率の低下は避けなければならない。そこで、サトウキビ搾汁液に容易に生育し、かつ、純糖率を低下させない乳酸菌をサトウキビ搾汁液から分離し、分離した乳酸菌で発酵させたサトウキビ搾汁液を用いて試作した黒糖の諸性質について検討した。
【方法・結果】黒糖工場の搾汁工程より、ショ糖を資化しない乳酸菌を分離した。分離した株は、形態観察、生理的性状試験、および 16S rRNA の塩基配列より、いずれも *Lactobacillus rossiae* に近縁の乳酸菌であった。分離した乳酸菌をサトウキビ搾汁液に接種して 30℃で静置培養した結果、Brix および純糖率に顕著な低下は見られなかった。次に、24 時間培養したサトウキビ搾汁液を用いて、黒糖を試作した。培養後のサトウキビ搾汁液を pH7.4 に調整して 80℃まで加熱し、遠心分離で不溶性成分を除去した（ライミング処理）後に常圧下で加熱濃縮して、Brix50 のシラップを調製した。黒糖の試作には、黒糖試験製造装置を用いた。黒糖試験製造装置は、黒糖製造工程のうち、黒糖の品質に大きな影響を及ぼす「仕上げ加熱」および「冷却撹拌」を機械的に行う黒糖試験製造方法[1)2)]を元に試作した装置である。製糖試験の結果、乳酸発酵させたサトウキビ搾汁液を用いても、通常黒糖（発酵させないサトウキビ搾汁液で試作した黒糖）と同様に黒糖製造が可能であった。得られた乳酸発酵黒糖は、通常黒糖と食味に顕著な差異は見られなかったが、水分や水分活性、着色度や色調等に違いがあるようであった。このほか、乳酸発酵させたサトウキビ搾汁液と乳酸発酵黒糖の成分、および乳酸発酵黒糖と通常黒糖との差異について報告する。

1）沖縄農研報，8，40-44（2014）． 2）沖縄農研報，10，17-22（2016）．
本研究は、「新たな時代を見据えた糖業の高度化事業（沖縄振興特別推進交付金事業)」において実施した。

lactic acid bacteria, sugarcane juice, non-centrifugal brown sugar

発表責任者：広瀬直人（hirosent@pref.okinawa.lg.jp）

講演番号：2A08a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A08 会場

生もと系酒母製造工程における微生物叢変遷の解析と乳酸生成に寄与する微生物の推定
Comprehensive analysis of bacterial diversity during *kimoto*-style starter culture making and estimation of bacteial species contributing largely to production of lactic acid
○高橋 正之、喜多 靖子、向井 伸彦 (酒総研)
○Masayuki TAKAHASHI, Yasuko KITA, Nobuhiko MUKAI (National Research Institute of Brewing)

【目的】
生酛酒母造りや山廃酒母造り（以下、「生酛系酒母」という。）では、製造初期に製品品質上好ましくない酵母や細菌の生育を抑制・殺菌するため、乳酸菌群の生育を誘導し乳酸を蓄積させることで安定的な醸造を可能としている。生酛系酒母では多くの微生物が関与していると考えられており、初期の細菌叢も製造場ごとに異なると考えられるが、製造場横断的にその詳細な微生物叢を明らかにした研究は少ない。本研究では、複数の製造場における生酛系酒母製造工程中の細菌叢と成分変化を詳細に解析し、生酛系酒母に共通する細菌叢の特徴と成分との関連性を見出すことを目的として実施した。
【方法】
本研究では東日本から 2 場、西日本から 3 場の計 5 場の清酒製造場から提供を受けた生酛系酒母の経時サンプル計 61 点の細菌叢をハイスループットシーケンサー（Illumina MiSeq）及び定量 PCR 法を用いて解析・定量し、亜硝酸や有機酸等の各種成分との関連性について検討した。
【結果と考察】
MiSeq により得られた細菌叢の OTU データを UniFrac－主座標分析により解析した結果、仕込水の細菌叢は各製造場で大きく異なっているものの、仕込後の日数経過に伴い類似した菌叢に収束する結果となった。これは、推定された細菌種のデータから Shannon Index を算出し経時的にプロットした際に、仕込水では高い多様度を示し、仕込後は経時的に多様度が減少していく傾向にあったことと一致し、特定の細菌の生育が誘導されていることを示唆する。また、細菌叢を構成する各種細菌の菌数変化を解析すると、いずれかの製造場で 10^6 cells/g 以上検出され、菌数の増加が見られた細菌は 20 属（38 種）であり、全製造場に共通して製造工程中で 10^6cells/g 以上検出された細菌は 4 属（4 種）存在した。製造場ごとに比較すると、最も菌体数が多かった細菌種は 4 製造場で *Lactobacillus sakei*、1 製造場で *Leuconostoc lactis* であった。各細菌種の菌体数と乳酸濃度の関係から、各細菌種が乳酸生成に与える影響を検討したところ、*L. sakei* や *L. lactis* の寄与が大きかった。*Leuconostoc mesenteroides* はすべての製造場で初期に生育が見られ、10^6cells/g 以上と一定量存在していたものの *L. sakei* や *L. lactis* と比較し菌体密度は低く、今回の解析では乳酸の生成に与える影響は小さいと推定された。

Kimoto, bacterial diversity, Sake

発表責任者：高橋正之（m.takahashi@nrib.go.jp）

講演番号：2A08a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母 *Saccharomyces kudriavzevii* 菌株の製パン適性

Applicability of the yeast Sacchromyces kudriavzevii for breadmaking by the sponge-dough method

○今井 涼太、山内 宏昭、小田 有二（帯広畜産大）
○Ryota IMAI, Hiroaki YAMAUCHI, Yuji ODA (Obihiro Univ. of Agri. & Vet. Med.)

【目的】パン製造において酵母はパン生地を膨張させ、焼成したパンに好ましい風味を付与するという役割があることから、従来と異なる酵母を使用することによりパンの差別化を図ることが可能と考えられる。これまでに通常のパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に近縁なワイン酵母 *S. kudriavzevii* 4 株について予備的に調べたところ、パン生地発酵力の高いものがあることを見出した。そこで、本研究では *S. kudriavzevii* 15 菌株からもっともパン生地発酵力の高いものを選抜し、その製パン適性について調べた。

【方法】*S. kudriavzevii* 菌株は，製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)から入手し，対照株として *S. cerevisiae* HP467（パン酵母汎用製品からの分離株）を使用した。酵母菌株は YPS 培地（2.0% Yeast extract, 4.0% Peptone, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0% NaCl, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% スクロース）で振盪培養した後，遠心分離で菌体を回収，洗浄して湿菌体を得た。この菌体から調製した懸濁液(固形分 33mg/ml)を使用して中種（無添加）および低糖（5%スクロース+2%NaCl 添加）の各パン生地からの炭酸ガス発生量（ml/2h/10g 小麦粉）をパン生地発酵力として調べるとともに，パン生地中での発酵と関係するインベルターゼおよびα-グルコシダーゼの両酵素活性を測定した。

【結果】*S. kudriavzevii* 15 菌株の中でマルトースを発酵しない 4 株を除いた 11 株を YPS 培地で培養し、菌体収量の低い 3 株および凝集性の 1 株以外の低糖パン生地発酵力を測定し、もっとも高い値を示した NBRC 104007 を選抜した。NBRC 104007 のインベルターゼ活性は HP467 より高く、α-グルコシダーゼ活性は 1/10 以下であった。培地の糖源をスクロースからマルトースに代替すると、NBRC 104007 のα-グルコシダーゼ活性は 100 倍以上に増加し、それに伴って中種生地の発酵速度は上昇した。次ぎに、NBRC 104007 をスクロースで培養した菌体(K-S)とマルトースで培養した菌体(K-M)および HP467 をスクロースで培養した菌体(C-S)を対照とした中種法による製パン試験を行った。パン比容積(ml/g)は K-S, 4.88±0.03、K-M, 5.04±0.19、C-S, 6.10±0.22 となり、マルトース発酵が高発現した菌体を使用することによりパンの品質は一部改善された。そこで、NBRC 104007 を製パン用酵母菌株 *S. cerevisiae* 一倍体菌株 H24(接合型 a)由来のウラシル要求性変異株 H24U1M と交雑させたところ、中種生地発酵が迅速化した菌株を取得することができた。

Saccharomyces kudriavzevii, maltose fermentation, breadmaking

講演番号：2A08a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母 *Zygosacchromyces rouxii* 菌株の異性化糖を含む超高糖生地製パン法への適用

Breadmaking by the sweet dough containing extra amount of isomerized sugar using the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*

○谷崎 昴、山内 宏昭、小田 有二 (帯広畜産大)
○Subaru TANIZAKI, Hiroaki YAMAUCHI, Yuji ODA (Obihiro Univ. of Agri. & Vet. Med.)

【目的】通常パンの甘味成分とともに酵母の発酵源として使用されるのはスクロースであるが、グルコースとフルクトースの混合物である異性化糖を使用する場合もある。しかし、高糖濃度の異性化糖を含むパン生地においては浸透圧の上昇により、通常の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では発酵が著しく阻害されるために使用することができない。一方、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は生育速度が遅く、スクロースを発酵することができないものの、*S. cerevisiae* が生育できないような高濃度の食塩や糖の存在下という過酷な条件で生育可能である。そこで、*Z. rouxii* が備えている特徴に注目し、従来のパン酵母では発酵できないような高濃度の異性化糖を含むパンの製造への利用について調べた。
【方法】食品から分離された *Z. rouxii* と寄託されている 14 菌株は製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)から入手し、対照株として *S. cerevisiae* HP467（パン酵母汎用製品からの分離株), *S. cerevisiae* HP911（パン酵母高糖生地用製品からの分離株）を使用した。酵母菌株は YPGlc 培地（2.0% Yeast extract, 4.0% Peptone, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% NaCl, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% グルコース）で振盪培養した後、遠心分離で菌体を回収、洗浄して湿菌体を得た。この菌体懸濁液(固形分 33mg/ml)を使用して低糖（5%グルコース+2%NaCl 添加）および超高糖（35%グルコース+0.5%NaCl）の各パン生地を調製し、前者は 2 時間、後者は 4 時間当たりの炭酸ガス発生量をパン生地発酵力として調べた。
【結果】*Z. rouxii* 14 株の中から生育不良の 6 株を除く 8 株について低糖パン生地発酵力を測定し、もっとも高かった味噌由来の NBRC 0533 を選抜した。NBRC 0533 は、培地中の NaCl 濃度を 3%まで上昇させると菌体収量は徐々に増加したが、超高糖生地発酵力は 1%で最高となった。一方、HP911 では培地中の NaCl 濃度とともに菌体収量は低下し、超高糖生地発酵力がもっとも高くなったのは 3%であったが、その水準は NBRC 0533 の半分程度であった。次ぎに、加糖中種法により小麦粉重量当たり異性化糖 35%を含む配合で製パン試験を行ったところ、パン比容積(ml/g)は NBRC 0533>HP911>HP467 であった。焼成したパンの官能評価を行うと、NBRC 0533 でつくったパンはボリューム、形状、焼き色、やわらかさ、色相、香り、味の項目で HP911 および HP467 よりも優れており、総合評価においても最高点であった。

Zygosaccharomyces rouxii, sweet dough, isomerized sugar

講演番号：2A08a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A08 会場

胞子対細胞接合による製パン用 *Saccharomyces* 属交雑株の作出
Interspecific hybridization to construct a baking strain of the yeast *Saccharomyces* by spore to cell mating

○横山 愛[1]、三雲 大[2]、森谷 浩[2]、高谷 政宏[3]、山内 宏昭[1]、小田 有二[1] ([1]帯広畜産大、[2]日本甜菜製糖（株)、[3]（公財）とかち財団)
○ Megumi YOKOYAMA[1], Dai MIKUMO[2], Hiroshi MORIYA[2], Masahiro TAKAYA[3], Hiroaki YAMAUCHI[1], Yuji ODA[1] ([1]Obihiro Univ. of Agri. & Vet. Med., [2]Nippon Sugar Beet Mfg Co., [3]Tokachi Foundation)

【目的】*Saccharomyces bayanus* はエタノール発酵能が *S. cerevisiae* より劣るものの、低温発酵に優れていることからワイン醸造等に使用されている場合がある。そこで、従来とは異なった風味を呈する高品質かつ差別化されたパンをつくるため、*S. bayanus* を製パン用 *S. cerevisiae* 菌株との交雑により、優れた製パン適性と良好な風味を生成する能力を備えた菌株の作出を試みた。
【方法】*S. bayanus* var. *uvarum* NBRC 10970 由来のリジン要求性変異株 B35L1 を胞子化させ、その胞子と製パン用酵母菌株 *S. cerevisiae* 一倍体菌株 H24(接合型 a)由来のウラシル要求性変異株 H24U1M を顕微鏡下で対合させ、胞子対細胞接合による交雑を行った。各菌株は YPS 培地で培養し、集菌、洗浄後の湿菌体を使用して低糖生地(小麦粉重量に対して 5%スクロースおよび 2%NaCl を含有)および中種生地（スクロースおよび NaCl 無添加）の発酵力を測定した。選抜した交雑株については DNA 解析による交雑の確認を行うとともに、中種生地の発酵経過を追跡した。対照としては、交雑の親株である NBRC 10970、H24 および製品パン酵母菌株 HP467 を使用した。製パン試験は標準的な中種法で行い、製造した食パンの官能評価を実施するとともに、パン内部の有機酸および香気成分を分析した。
【結果】*S. bayanus* var. *uvarum* B35L1 と *S. cerevisiae* H24U1M との交雑により分離した 56 株(DHB01～56)の低糖生地および中種生地の発酵力から一株 DHB19 を選抜した。パルスフィールドゲル電気泳動による染色体 DNA の分離パターンおよび *Saccharomyces* 種の特異的プライマーによる PCR 断片の解析により、DHB19 は両親株の遺伝形質を引き継いだ交雑株であることを確認した。中種生地からの炭酸ガス発生の経時変化を追跡すると、HP467 は一般的なパン酵母と同様、生地中にわずかに存在する単糖類を発酵して 1 時間以内に消費し、その後は小麦粉に含まれる β-アミラーゼなどの作用によってデンプンから生成するマルトースを発酵する曲線を描いた。NBRC 10970 は低い値で推移したが、中種生地発酵力の高い H24 との交雑により作出した DHB19 では HP467 を凌ぐほど大きく改善されていた。DHB19 および HP467 の培養菌体を使用して中種法によって食パンを製造したところ、比容積はそれぞれ 5.55±0.21 および 5.81±0.12 であり、DHB19 で製造したものは若干低かったものの、5.0 以上の十分に評価できる値であった。さらに官能評価において、HP467 と比較すると DHB19 で製造したパンはボリュームを除いた評価項目において同等以上の得点であり、特に味の違いと香りの違いにおいては有意に高く、総合評価においても上回る良好な評価であった。

Saccharomyces bayanus, *Saccharomyces cerevisiae*, interspecific hybrid

講演番号：2A08a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A08 会場

奈良県内の醤油蔵の蔵付微生物の分離とその性質

Isolation and Characterization of Proprietary Microorganism from Soy-sauce Manufacturers in Nara

○都築 正男[1]、清水 浩美[1]、松澤 一幸[2]([1]奈良県産振セ、[2]元奈良県醤油組合)
○Masao TSUDUKI[1], Hiromi SHIMIZU[1], Kazuyuki MATSUZAWA[2] ([1]Nara Pref. Inst. Indust. Dev., [2]Nara Pref. Soy-sauce Indust. Coop.)

【目的】醤油の醸造において、麹菌が大豆タンパク質を分解し、アミノ酸を生成して旨味をつくりだす。これに対して、耐塩性の乳酸菌は pH を低下させて雑菌の増殖を抑制し、また香味、色、窒素利用率が適切な醤油を作り出すのに役立っていると考えられている。また耐塩性酵母は、醤油の香気成分を生成する。酵母は醤油諸味中で働く時期によって主発酵酵母と後熟酵母に大別され、前者は甘いカラメル様の香りをもつ 4-ヒドロキシ-2(or5)-エチル-5(or2)-メチル-3(2H)-フラノン(HEMF)を生成する。後者は複数のフェノール系の香気成分を生成し、醤油の味の幅や押味、熟成香を付与する。奈良県では 13 社の醤油会社により醤油が作られており、そのほとんどは昔ながらの製法により醤油を醸造しており、乳酸菌や酵母は、醤油蔵に棲み付いた蔵付きのものが発酵に関与している。本研究では県内各社の醤油諸味などから蔵付き乳酸菌、酵母の分離と同定を行い、得られた菌株が生成する主な成分の分析を行い、その特徴を調査し、菌株の保存行ったので報告する。
【方法】醤油諸味および木造建物の梁の拭き取り物を、塩化ナトリウム 10%を含む培地を用いて分離した。酵母は産膜を形成しない酵母を選択して分離した。また、乳酸菌は BCP 寒天培地で黄色いハロを形成するコロニーを選択して分離した。分離した酵母は、ID32CAPI および 28SrDNA D1/D2 領域の塩基配列で同定を行い、生成する香気成分の分析を行った。主発酵酵母は HEMF を GCMS で分析し、後熟酵母は、4-ビニルグアイヤコール、4-ビニルフェノール、4-エチルグアイヤコール、4-エチルフェノール（4-VG、4-VP、4-EG、4-EP）を HPLC で分析した。分離した乳酸菌は、カタラーゼ試験の後、16SrDNA の塩基配列で同定を行い、有機酸を CE で分析し、ヒスタミン産生性を調べた。
【結果】酵母は 373 菌株を分離した。採取地・コロニーの外観の異なる 74 菌株を同定したところ、*Zygosaccharomyces rouxii* が 19 菌株（主発酵酵母）、*Candida etchellsii* が 15 菌株、*Candida versatilis* が 17 菌株（以上、後熟酵母）、その他発酵に関わっていないとされる酵母が 4 種 23 菌株得られた。主発酵酵母は全て HEMF を生成するが、生成量は菌株により 3.6 倍の差が見られた。後熟酵母 *Candida etchellsii* は 4-VG を生成する菌株が 7 菌株、4-VP を生成するものはなかった。*Candida versatilis* は 4-EG、4EP を生成し、菌株によりそれぞれ 3 倍、8.7 倍の生成量差があった。乳酸菌は 132 菌株を分離し、そのうち 16 菌株を同定したところ、全て *Tetragenococcus halophilus* であった。全ての菌株でカタラーゼ試験、ヒスタミン産生性は陰性であった。有機酸は乳酸の他、酒石酸、酢酸、リン酸を生成した。

Soy sauce, Yeast, Lactic bacteria

発表責任者：都築正男（tsuduki-masao@office.pref.nara.lg.jp）

講演番号：2A08a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A08 会場

圧力感受性を付与した清酒酵母株の日本酒醪中における高圧不活性化挙動の解析

High pressure inactivation behavior of piezosensitive *sake*-yeasts in fermentation mash

○野村 一樹、片岡 ちひろ、星野 浩史、井越 和彰、氏家 沙織里、林 真由美、井口 晃徳、重松 亨 (新潟薬大・応生科)
○Kazuki NOMURA, chihiro KATAOKA, Hirofumi HOSHINO, Kazuaki IGOSHI, Saori UJIIE, Mayumi HAYASHI, Akinori IGUCHI, Toru SHIGEMATSU (NUPALS)

【背景】 高圧技術とは、1,000 気圧 (100 MPa) 以上の非常に高い圧力 (高圧) により、非熱的に微生物を殺菌する食品加工技術の一つである。我々は、高圧処理により発酵を制御する (Pressure Regulated Fermentation; PReF) 技術を提唱している[1]。しかし、高圧処理コストは処理圧力レベルに比例して増加するため、より低い圧力で不活性化する圧力感受性微生物の作出が必要である。我々は醸造に利用される *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして、*COX1* 遺伝子の欠損が圧力感受性に強く寄与していることを明らかとした[2]。そこで、清酒酵母であるきょうかい酵母 7 号に対して、*COX1* 遺伝子が欠損した圧力感受性変異株を接合させることにより、圧力感受性を付与することに成功した[3]。本研究では、作出した酵母株を用いて小仕込み試験を実施し、醪中における高圧不活性化挙動を評価した。
【方法・結果】本研究では、清酒酵母 *S. cerevisiae* Sake yeast Kyokai No. 7 RIB No. 1003 株 (K7 株) を対照株とし、その一倍体 *S. cerevisiae* RIB No. 2006 株と実験室酵母 *S. cerevisiae* KA31a 株から紫外線照射法により単離した圧力感受性酵母 *S. cerevisiae* a924E1 株より作出した二倍体 KE03 株および KE45 株を用いた。これらの株は K7 株と比較して、YPD 培地中において高圧処理により有意に生菌数が減少した。小仕込み試験の醸造温度は、初添段階 15°C、仲添段階 9°C、留添段階 7°C とし、それ以降は 1 日 1°C ずつ温度を上げ、15°C に到達後は 15°C 一定で管理した。醸造 4 週間後の KE03 株、KE45 株および K7 株の醪サンプルを 200~225 MPa、室温、10 min の条件で高圧処理に供した。その結果、KE03 株および KE45 株は高圧処理により有意な生菌数の減少を示した。一方、醪中の K7 株は、YPD 培地にて培養した場合と比較して有意に生菌数が減少し、その値は KE03 株および KE45 株の生菌数よりも少なかった。この原因として醪中に残存する糖質等の保護作用が考えられたため、醪サンプルをろ過した後に高圧処理を実施したが、K7 株の方が KE03 株および KE45 株よりも生菌数が減少する同様の傾向が認められた。これらの結果は、培養・醸造条件が高圧不活性化に大きく影響することを示唆している。また、小仕込み試験後の K7 株の生菌数が KE03 株および KE45 株よりも低かったことから、実験室酵母 a924E1 株由来の遺伝特性によって、清酒酵母の生存が難しい醸造環境に適応し、結果的に K7 株よりも高圧に耐性を示したことが推察された。現在、*COX1* 遺伝子をターゲットとし、実験室酵母に由来する遺伝特性を持たない圧力感受性株を育種している。本研究は、生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業 (地域戦略プロジェクト) 」により実施した。 [1] Nomura and Iwahashi, Rev. Agri. Sci., 2014. [2] Nomura *et al.*, J. Food Sci., 2015. [3] Nomura *et al.*, 55th EHPRG, 2017.

Sake yest, high hydrostatic pressure, pressure regulated fermentation

発表責任者：野村 一樹（nomura@nupals.ac.jp）

講演番号：2A08a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母エキスを用いた清酒酵母拡大培養用の培地の検討

Selection of culture condition for sake-yeasts cultivation using yeast extracts in substitution for Koji-juice

○渡部 貴志、櫛田 麻希、増渕 隆（群馬産業技術センター）
○Takashi WATANABE, Maki KUSHIDA, Takashi MASUBUCHI (Gunma Industrial Technology Center)

【背景・目的】現代の清酒造りでは、拡大培養した清酒酵母を添加して酒母造りが行われている。大多数の酒造会社は中小零細会社であるため、各都道府県公設試の清酒担当者が自社酵母や県独自酵母の拡大培養を担当している。この拡大培養には、麹米を糖化して作る麹エキスを用いているが、麹造りや糖化作業に多大な時間と労力が使われている。このため、乾燥麹や冷凍麹エキスを民間企業から購入し、省力化を行っている公設試もあるが、原価が跳ね上がるといった課題がある。群馬県では、従来は麹造りから行っていたが、業務の効率化を図るため、3 年前より冷凍麹エキスを希釈してグルコースとグルタミン酸、リンを補てんする希釈麹エキスを用い始めた。この結果、1 本あたりの酵母提供までにかかる時間は、5 分の 1 近くまで短縮できたが、原価は 3 倍程度となり、酒造会社から酒母の経過が変わっている気がすると指摘が出てきた。調査の結果、普通酒などに用いられている固形酵母は、原価の安い廃糖蜜で培養し、洗浄して糖蜜色素を除去していることや、酵母エキスを拡大培養の栄養成分として用いることに酒税法上の問題が無いことも分かった。そこで本研究では、原価は従来の麹造りから行ったものと同程度以下でかつ、酒母造りに影響がない良質な拡大培養酵母を提供することを目的に、食品添加物用の酵母エキスを用いた培地条件を検討することにした。
【方法・結果】まず、麹エキス、希釈麹エキスと酵母培養用に用いている YM5 培地（YM 培地のグルコースを 50 g／L にしたもの）で好気培養を行ったところ、きょうかい 701 号（K701）の最大増殖量（OD_{660}）が麹エキスで 7.7、希釈麹エキスで 5.8、YM5 培地で 23.7 と大きな差が生じた。このため、栄養成分を比較したところ、従来の麹エキスに比べて希釈麹エキスは全窒素が半分程度で不足し、全リンが約 5 倍で多すぎることが分かった。また、希釈の影響で麹エキス由来のビタミンや微量元素なども不足していることが推測された。YM5 の全リンは麹エキスの 2 倍量であったのに対し、全窒素は 4 倍量あることが分かり、これらの量を適性値まで減らす必要性が感じられた。なお、YM5 に含まれている麦芽エキスやペプトンは、酒税法上使えないことから、酵母エキスのみを窒素源とビタミン・微量元素源とし、リン酸一カリウム、グルコースで培地を作成することにした。種々の酵母エキスで酵母の増殖を調べたところ、食品添加物用の酵母エキス（ミースト P1G）に高い増殖性が認められたため、全窒素、全リンを確認しながら、麹エキスと同等の増殖量の培地を検討した。総米 200g での酒母造りの小仕込み試験を行ったところ、麹エキスで培養したものの醸造成分と比べ、希釈麹エキスのものは異なっていたのに対し、酵母エキス培地のものは同等であった。

yeast extracts, sake-yeasts, culture condition

発表責任者：渡部貴志（watanabe-t@pref.gunma.lg.jp）

講演番号：2A08a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A08 会場

Saccharomyces cerevisiae 酵母における *Candida boidinii* 由来キシロース発酵代謝系の導入効果
Xylose metabolism pathway from *Candida boidinii* upgrades the xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*

○Kahar Prihardi、紀平 知枝、大塚 裕美、荻野 千秋、近藤 昭彦 (神戸大工)
○Prihardi Kahar, Chie Kihira, Hiromi Otsuka, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo (Kobe Univ.)

エタノール発酵酵母である *Saccharomyces cerevisiae* はキシロース代謝機能をもたないため、実バイオマスの糖化過程に生成されるキシロースからエタノール発酵することはできない。そのために、キシロース資化機能を付与する必要である。しかしながら、導入されるキシロース資化系は外来遺伝子であることで、高効率的に機能できないため、キシロースからのエタノール発酵の効率（菌体あたり）は非常に低くなるのが現状である。主な原因は実バイオマスから放出された発酵阻害物質（ICC）による酸化ストレスで酵母の全体的代謝活性が低下していると考えられる。そこで、本研究では酵母ライブラリーからキシロース資化できる ICC 耐性酵母をスクリーニングし、当酵母におけるキシロース発酵機能についてメタボロームおよび遺伝子発現解析を行った。

キシロースを利用できる約 240 株に対してスクリーニングを行った結果、実バイオマスの分解液に多く含まれている発酵阻害物質であるフルフラール、5-HMF、バニリン、シリンガアルデヒド、酢酸、ギ酸およびレブリン酸に耐性を示した *Candida boidinii* K212 株を獲得した。当酵母株は、唯一のキシロースからキシリトールを生成せずにエタノール発酵ができる。そこで、De Novo アセンブリにより K212 の全ゲノム解読を行い、キシロース輸送やキシロース発酵に関係するコーディング領域の特定はできた。

K212 株のゲノムにはキシリトール脱水素酵素（XDH 相当）およびキシルロースキナーゼ（XK 相当）をコーディングする遺伝子が存在しているが、キシロース還元酵素（XR 相当）の遺伝子が欠損している。面白いことに、キシロースイソメラーゼ（XYLA 相当）の遺伝子が確認できたため、XR の代わりに XYLA が使われる可能性が非常に高いと考えられる。発見した K212 由来の XYLA は細菌類 *Pyromyces* 由来ものと比較できる推定タンパク構造をもっており、活性のある真核類キシロースイソメラーゼとして提案できる。さらに、XDH は発酵過程から漏れて生じたキシリトールを完全にキシルロースに完全に変換するために使われると考えられる。今まで REDOX に偏った XR/XDH/XK 系の導入、それとも REDOX に依存しない XYLA/XK 系の導入(conventional)が多く提案されてきた。こうして、キシロース資化できる ICC 耐性酵母から学んだことで、キシロース発酵の飛躍的向上は XYLA/XDH/XK 系（consortium）の導入から検討すべきであろう。我々は XYLA/XDH/XK 系を評価するために、これらの遺伝子を *S. cerevisiae* に導入してキシロースの発酵機能を評価してみた。

xylose fermentation, inhibitor tolerant, yeast

講演番号：2A08a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A08 会場

大分県酒造協同組合蔵元酒粕からの清酒用大分酵母の獲得
Acquirement of Oita yeast for Sake from the sake lees provided breweries belonging to Oita prefecture Sake brewing cooperative association.
○岡本 啓湖[1]、小野 浩輝[1]、池見 俊亮[1]、掛橋 凌[1]、木村 奨[1]、張 愚皓[1]、仁平 拓哉[1]、永松 一馬[1]、中村 俊雅[1]、日野 美香[1]、藤原 秀彦[1]、二階堂 雅士[2] ([1]別大・食栄・発食、[2]大分県酒造協同組合)
○Keiko Okamoto[1], Hiroki Ono[1], Shunsuke Ikemi[1], Ryou Kakehashi[1], Shou Kimura[1], Uho Jan[1], Takuya Nihei[1], Kazuma Nagamatsu[1], Toshimasa Nakamura[1], Mika Hino[1], Hidehiko Huzihara[1], Masashi Nikaido[2] ([1]Beppu Univ., [2]Oita prefecture Sake brewing cooperative association)

【目的】九州環内で大分県を除く全ての県が独自の清酒用酵母を保有している中，大分県酒造組合では大分県内で得られる生産物から協会酵母に匹敵するような高いエチルアルコール生成能を有し，且つ協会酵母と性質を異にする新酵母を模索していた．そこで本研究は大分県酒造組合との共同研究より，大分県酒造組合加盟酒造会社 18 社の酒粕，3 社の生酛より協会酵母との特性比較を基本姿勢として，新酵母の分離・同定・選抜を行い，更に得られた菌株を用いて各種製法により得られた試醸清酒の成分分析，官能検査により清酒用大分酵母の選抜を行った．**【第１スクリーニング方法及び結果】**酒粕からの酵母の分離法として，協会酵母との相違が明確に見られる高リン酸培地（TTC 下層培地）での酸性ホスファターゼ活性の有無による培養方法を用いた．判定にはジアゾカップリング法（DC 染色法）により行い，DC 非染色性 70 菌株，DC 染色性 13 菌株を分離した．これら両菌株に対して，ダーラム管による発泡試験，顕微鏡による細胞形状観察，エチルアルコール生成量測定試験，マルチプレックス PCR による *S. cerevisiae* 株の簡易同定(SSU1，AWA1，BIO6，FLO1)遺伝子の存在確認)等を行い，更に一段小仕込み醪モデル試験に供し，清酒大分酵母開発委員会の香りに基づく判定も加わえ，DC 非染色性 6 菌株(KCT002，KDT043，KET001，KET002，KET011，KGT006)，DC 染色性 10 菌株（ロ-1，ハ-1～4，チ-2～6）を選抜した．**【第２スクリーニング方法及び結果】** DC 非染色性及び染色性分離菌株を，独立法人酒類製造総合研究所作成製造法を用いて 15℃及び 10℃での小仕込み試験にて製造した清酒の成分分析（エチルアルコール生成能，グルコース生成能，酸度・アミノ酸度，アミノ酸組成及びその濃度，低沸点香気成分解析）を行い，清酒協会酵母 9 号，7 号に類似する菌株を推奨し，清酒酵母開発委員会により 3 菌株，即ち DC 非染色性菌株である KET002，DC 染色性菌株であるハ-4，チ-2 を選抜した．**【第３スクリーニング方法及び結果】**選抜された三種類の菌株を小仕込み試醸清酒（70%精米五百万石，70%精米ひのひかりを原料とした三段仕込み法）に供し．各試譲清酒の分析（酸度・アミノ酸度及び pH 測定，グルコース定量，有機酸組成解析，アミノ酸組成解析，低沸点香気成分解析）を行い，DC 非染色性の KET002，DC 染色性のハ-4 を選抜した．更に 70%精米ひのひかりを原料とし，総米 100kg にスケールアップした試醸清酒の製造・分析（グルコース，酸度，アミノ酸度定量及び有機酸組成解析，香気成分解析），更に市場化に向けての別府大学学生に対する官能検査を取り入れ，清酒用大分酵母の選抜を行った．これらの結果，特性が清酒協会酵母 9 号に近いハ-4 が清酒用大分酵母№1，清酒協会酵母 9 号と相違する KET002 が清酒用大分酵母№2 と決定した．

Oita yeast, sake lees, Oita prefecture Sake brewing cooperative association

発表責任者：岡本　啓湖（kokamoto@nm.beppu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A08 会場

新奇「岐阜大酵母」のスクリーニングと清酒発酵特性の検討
Isolation of Gifu yeast strains and its *Sake* fermentaiton characteristics

○奥村 真衣[1]、平井 菜未[1]、内田 みなみ[1]、吉村 明浩[2]、澤井 美伯[2]、正木 和夫[2]、二神 泰基[3]、玉置 尚徳[3]、向田 潤[4]、三井 亮司[4]、稲垣 瑞穂[1]、島田 昌也[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1]([1]岐阜大応生、[2]岐阜県産業技術センター、[3]鹿児島大農、[4]岡山理科大理)
○Mai OKUMURA[1], Nami HIRAI[1], Minami UCHIDA[1], Akihiro YOSHIMURA[2], Yoshinori SAWAI[2], Kazuo MASAKI[2], Taiki FUTAGAMI[3], Hisanori TAMAKI[3], Jun MUKAIDA[4], Ryoji MITSUI[4], Mizuho INAGAKI[1], Masaya SHIMADA[1], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Industrial Tech. center Gifu Pref. Govt., [3]Kagoshima Univ., [4]Okayama Univ. of Sci)

【目的】

近年、食生活の多様化と嗜好の変化、日本酒の国際市場への進出なども相俟って、様々な特徴を持った個性的な清酒の開発の必要性が高まっている. 清酒の「個性」は清酒酵母の持つ様々な能力によって決定づけられるため、より魅力的な清酒の開発に向けてきょうかい酵母とは異なる発酵特性を持つ新奇で特徴的な能力を持つ清酒酵母の育種が求められている。

私たちの研究グループでは、岐阜の魅力を発信するための地域ブランドの確立を目指し、「岐阜大酵母」の開発に向け、岐阜県各地から新奇な清酒酵母のスクリーニングを試みている. 本研究では、これまで単離した「岐阜大酵母」の遺伝学的特徴さらには醸造特性について解析を行い、「岐阜大酵母」の清酒酵母としての「個性」を評価した。さらに、選抜された「岐阜大酵母」の「個性」を生かす醸造条件について検討を行った。

【結果・考察】

岐阜県各地の 600 以上のサンプルから 22 株の *Saccharomyces cerevisiae* を獲得し、その中から発酵力および発酵香を指標に GY-38 株、GY-115 株、GY-156 株および GY-172 株の合計 4 株を岐阜大酵母の候補株として 1 次選抜した。これら 4 株の遺伝学的特性を、Fujihara らの方法を用いて（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014. **78**:1086)、4 株のゲノム上に清酒酵母に特徴的な 4 遺伝子 *SSU1*、*AWA1*、*BIO1*、*FLO1* が存在するかどうか解析を行った。その結果、GY-115 株はきょうかい 7 号（K7）と同様に 4 遺伝すべての増幅が認められ、GY-115 株は清酒酵母に近い遺伝学的性質を持つことが推測された。さらに、ゲノムレベルの系統関係を反映する *THI7*、*ZAP1*、*PXL1*、*GLG1*、*YRR1* を指標に系統解析を行ったところ（*Yeast*, 2017. **34**:407)、GY-115 株がきょうかい酵母に最も近縁であり、GY-38 株と GY-156 株はパン酵母などと近い系統であった。清酒のオフフレーバーである 4-ビニルグアイヤコール(4-VG)を生成能を観察したところ、GY-115 株のみが 4-VG 生産せず、その合成遺伝子 Fdc1p にナンセンス変異が生じていた。さらに総米 200 g の小仕込み試験による官能評価の結果も踏まえ、今回, GY-115 株を岐阜大酵母と選抜し、総米 10 kg の試験醸造を行った。その結果、GY-115 株は独特な酸組成を持つ清酒を醸し、酸度が非常に高い清酒となった。そこで日本酒度を抑えることを目的でより低温（最高 10.2℃）で試験醸造を行ったところ、甘口で爽やかな酸味の清酒（アルコール度 14.9, 酸度 2.27）を醸造することができた。

Saccharomyces cerevisiae, *Sake*, *Sake* yeast

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A08 会場

国酒酵母の分類学的特性と識別
Taxonomic characteristics and identification of Japanese Kokushu yeast
○森谷 千星、門倉 利守、数岡 孝幸、竹田 正久、田中 尚人、鈴木 健一朗（東農大応生科・醸造）
○Chise MORIYA, Toshimori KADOKURA, Takayuki KAZUOKA, Masahisa TAKEDA, Naoto TANAKA, Kenichiro SUZUKI (Dept.Ferment.Sci., Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】国酒酵母は分類学上 *Saccharomyces cerevisiae* に分類されているが、実際には *S. cerevisiae* と異なる性質を多く有している。しかし、多くの株を用いた分類学的な位置の検討があまりなされていないため、その位置は不明瞭となっている。また、醸造産業では酵母を酒類ごとに経験的に区別して用いているため、酵母の選択は最も重要であり、各酒類醸造に適用可能な株を正確かつ容易に選択できるようにすることが求められている。そのため、国菌の *Aspergillus oryzae* が独立した種として認められているように、国酒酵母も *Saccharomyces* 属における分類学的位置と共に実用上の区別を明確にする必要があると考えられる。そこで本報告では、当研究室の指標と THE YEASTS 5th の *Saccharomyces* 属 Key to species の試験から、国酒酵母の分類学的特性を明確にし、*Saccharomyces* 属の種と国酒酵母の識別の方法、及び国酒酵母を実用的に区別する方法について検討した。
【方法】供試菌株として、国酒酵母の清酒酵母 25 株(協会清酒酵母 11 株)、焼酎酵母 31 株(1964 年竹田分離株 28 株)、泡盛酵母 17 株(1964 年竹田分離株 13 株)、及び国内保存の国酒関連の酵母 21 株を用いた。また、対照として、*Saccharomyces* 属の 8 種と *S. eubayanus* の全 39 株を用いた。試験方法として、研究室の指標の ITS 領域の塩基配列、SDS-PAGE における GAPDH アイソザイムパターン、AWA1 遺伝子断片の有無、イーストサイジン耐性、*L. casei* との凝集性、33℃メレジトース資化性、カリウム欠培地における増殖、酸性ホスファターゼ活性を用いた。また、THE YEASTS 5th の Key to species からビタミン欠培地における増殖、メリビオース資化性、グリセロール資化性、37℃における増殖、マルトース発酵性を用いた。
【結果】国酒酵母は *S. cerevisiae* と区別され、他の *Saccharomyces* 属とも異なる性質を示し、それらの分類学的特性から *Saccharomyces* 属の種とは異なる 4 群(清酒酵母 1 群、焼酎酵母 2 群、泡盛酵母 1 群)を形成すると考えられた。これらの分類学的特性を用いた国酒酵母の識別の方法として、ITS 領域の塩基配列、SDS-PAGE における GAPDH アイソザイムパターン、ビタミン欠培地における増殖、AWA1 遺伝子断片の有無、イーストサイジン耐性、*L. casei* との凝集性、メリビオース資化性、グリセロール資化性が、国酒酵母を含む *Saccharomyces* 属の識別を行う上で有用であることが示唆された。また、国酒酵母では 33℃メレジトース資化性、カリウム欠培地における増殖、酸性ホスファターゼ活性を加えることで、それぞれの酒類醸造で現在実用されている株を区別できる可能性が示唆された。

Japanese Kokushu yeast, Taxonomy, *S.cerevisiae*

発表責任者：門倉　利守（kadokura@nodai.ac.jp）

講演番号：2A08a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A08 会場

Bafilomycin A1 耐性清酒酵母の醸造特性
Brewing properties of Bafilomycin A1-resistant mutants isolated from sake yeast.
○中瀬 舞、西本 遼、窪寺 隆文、明石 貴裕（白鶴酒造・研究）
○Mai NAKASE, Haruka NISHIMOTO, Takafumi KUBODERA, Takahiro AKASHI (Hakutsuru R&D)

【目的】
我々はこれまでに清酒酵母（*S. cerevisiae*）のクロトリマゾール（CTZ）耐性株から、高確率でアルコール高発酵性株を取得できることを見出した[1]。しかし、CTZ 耐性株で醸造した清酒は、酸度が上昇する傾向がある。そこで、酸度に影響しない高発酵性株の育種法を検討した。
【方法および結果】
CTZ 耐性株は ATP binding cassette（ABC）トランスポーターの高発現により細胞内の ATP が低下するため、解糖系が亢進してアルコール発酵性が向上したと推測しており、本株の清酒醸造試験において、全発酵期間を通して細胞内の ATP 量が顕著に低下することが報告されている[2]。また、ABC トランスポーターは細胞内物質を非特異的に排出するため、酸度上昇の原因は細胞内の有機酸排出である可能性が示唆された。そこで、細胞膜局在 ABC トランスポーターではなく、液胞膜局在 ATPase（V-ATPase）の活性化により細胞内の ATP 量を低下させることで、酸度の上昇を抑制した高発酵性酵母の育種を試みた。
V-ATPase 高活性型株を取得するために、UV 照射で変異誘導した清酒酵母から V-ATPase 活性阻害剤である Bafilomycin A1 に対して耐性を示す自然変異株を選抜した。選抜株を用いて小スケール（総米 50 g）の清酒醸造試験を行ったところ、高確率で高発酵性が付与されていた。さらに、高発酵性株を総米 400 g の小仕込み試験に供したところ、高発酵性と共に、酸度は親株と同程度で、アミノ酸度は親株より低下していることが確認できた。現在、これらの株の細胞内 ATP 量や液胞内 pH などを測定し、メカニズムの解明に取り組んでいる。

１．広畑ら（1994）生物工学, 72, 283.
２．Watanabe *et.al.* (2000) *J. Biosci. Bioeng.* 89, 577-581.

S. cerevisiae, Sake

講演番号：2A08p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A08 会場

二倍体清酒酵母から得られた一倍体株の遺伝的特徴とその醸造特性

Genetic characteristics of haploid sake yeast strains and its brewing property

○堀田 夏紀、村上 直之、小高 敦史、松村 憲吾、秦 洋二（月桂冠・総研）
○Natsuki HOTTA, Naoyuki MURAKAMI, Atsushi KOTAKA, Kengo MATSUMURA, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

【目的】清酒酵母の育種では、二倍体に直接変異処理を施すことが多い。しかし、二倍体には各染色体が 2 本ずつ存在するため、劣性変異株の取得が難しい。一方、一倍体は各染色体が 1 本しかないため、劣性変異であっても形質として現れやすい。一倍体を掛け合わせることで新たな形質を獲得した株を育種することもできるため、一倍体をうまく活用することで、特徴的な酒質となる酵母を育種することが可能になる。本研究では、新たな酵母育種への応用を目指して当社保有二倍体清酒酵母 GA-1 から一倍体を取得し、得られた一倍体の性質を明らかにすることを目的として清酒醸造試験及び全ゲノムシーケンス解析を行った。

【方法】二倍体酵母 GA-1 を胞子形成させ、接合型が a または α のみを示した株を一倍体とした。親株、一倍体 12 株を総米 200 g の清酒醸造試験に供し、各種分析を行った。全ゲノムシーケンス解析には HiSeq システム（イルミナ社）を用いた。

【結果・考察】胞子形成培地から、一倍体 12 株を取得した。清酒醸造試験では、一倍体は二倍体と比べ、もろみ初期の発酵がやや遅かった。また、有機酸や香気成分のバランスが変化している一倍体もあった。全ゲノムシーケンス解析の結果、一倍体の各染色体の変異の出現頻度より、一部または全体に重複が起こっている染色体があり、一倍体ではなく異数体であると推察された。一倍体取得の際に指標とした接合型遺伝子 *MAT***a** および *MATα* の存在する 3 番染色体は、ゲノムシーケンス解析に用いた一倍体 12 株全てで 1 本になっていると推定された。また、この 3 番染色体では、解析に用いた一倍体 12 株のうち 1 株で、染色体の乗り換えが起こっていると考えられた。接合型を指標として一倍体を取得してきたが、清酒酵母の部分異数性に関する報告もあることから、清酒酵母では減数分裂時に染色体不分離が起こりやすいと考えられる。現在、醸造特性とゲノムデータとの関連について詳細に解析を進めている。

Saccharomyces cerevisiae, haploid, next-generation sequencing

発表責任者：堀田　夏紀（hotta@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2A08p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A08 会場

きょうかい清酒酵母の胞子形成で得られた一倍体株では染色体組換えが生じていない

Meiotic recombination does not occur in the sporulation of kyokai sake yeasts

○川村 夏希、花角 優太、山田 美和、下飯 仁 (岩手大農)
○Natsuki KAWAMURA, Yuta HANAZUMI, Miwa YAMADA, Hitoshi SHIMOI (Iwate Univ.)

【目的】
清酒醸造に用いられている清酒酵母は胞子形成能が低く、まれに生じた胞子もほとんど発芽しないことが知られている。我々は、その原因の一つとして減数分裂における染色体組換え不全に注目している。今までに、清酒酵母きょうかい 7 号(K7)の 3 番染色体に存在する 2 つのヘテロザイゴシティーの分離および K7 一倍体ゲノム DNA の次世代シーケンサーを用いた解析の結果、K7 では減数分裂時の染色体組換えに異常があることが示唆された[1)]。今回は、実験室酵母 X2180、清酒酵母きょうかい 6 号(K6)、K7、9 号(K9)、10 号(K10)について同一染色体に存在する 2 種類の薬剤耐性・栄養要求性マーカーを用いて減数分裂時の染色体組換えの有無を検証した。
【方法】
それぞれの菌株について 5 番染色体左腕の *URA3* をクロンナット耐性遺伝子（*natMX*）で、*CAN1* を G418 耐性遺伝子（*kanMX*）で破壊して、ダブルヘテロザイガス株（*URA3/ura3 CAN1/can1*）を作成した。実験室酵母については胞子形成後四分子解析を行い、セグレガントの G418 耐性、カナバニン耐性、クロンナット耐性、ウラシル要求性を調べた。清酒酵母については胞子形成後、熱処理を行い、カナバニン含有培地上で生育したコロニーを選抜した。得られた菌株について、さらにフェロモン生産試験を行い、フェロモンを生産する菌株を一倍体として表現型の試験を行った。
【結果】
実験室酵母の四分子解析の結果、38%の頻度で組換え型の表現型が観察され、この方法で減数分裂時の染色体組換えが検証できることを確認した。清酒酵母については、途中で劣性変異であるカナバニン耐性で選択しているため、染色体組換えが正常に行われていた場合は 2 種類の表現型（*URA3 can1* および *ura3 can1*）が存在することが予想された。しかし、実際には取得した K7 一倍体株全てで 1 種類のみの表現型が観察された。他の清酒酵母 K6、K9、K10 でも同様に一倍体株全てで 1 種類のみの表現型が観察された。以上の結果から、清酒酵母 K6、K7、K9、K10 では減数分裂時に染色体組換えが生じていないと考えられる。
１）花角優太ら　2017 年度日本農芸化学会大会　3C23a06

sake yeast, meotic recombination, sporulation

講演番号：2A08p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A08 会場

カプロン酸エチルを高生産する泡盛酵母の取得

Construction of awamori yeast producing a higher amount of ethyl caproate

○佐伯 隆登、仲宗根 薫（近畿大工）
○Takato SAEKI, Kaoru NAKASONE (Kindai Univ.)

【背景】醸造発酵過程で酵母により生成されるカプロン酸エチルは、吟醸酒の商品価値を高める点で重要である。本物質はカプロン酸のエステル化により生成する。カプロン酸はカプロイル CoA から生成するが、この前駆体は脂肪酸合成経路におけるアセチル CoA 及びマロニル CoA から生合成される。この反応には、脂肪酸合成酵素複合体（FAS1 及び FAS2）が重要な役割を果たしている。カプロン酸エチル高生産変異株の取得は、これまで清酒酵母を中心に、FAS2 遺伝子に着目して育種が行われてきた。本研究では、泡盛の芳香を豊かにする一つの候補として本物質に着目し、カプロン酸エチル高生産泡盛酵母の育種を目指した。

【方法及び結果と考察】pAURFAS2-6（nbrp yeast 由来）プラスミドを泡盛 101 酵母に形質転換を行い、赤田らが開発した 2 段階遺伝子置換法により、FAS2(1)の 1250 番目が Gly から Ser に置換した FAS2-1250S の取得を試みた。本変異株はセルレニン耐性になることが知られており、これを指標として目的株のスクリーニングを行った。FAS2 遺伝子の 1250 番目のグリシンをコードする塩基 GGT（野生株）は、変異株では AGT に塩基置換（Gly→Ser）されていることが確認され、目的の泡盛酵母が得られた。さらに pGG119FAS2A、pGG119FAS2C、pGG119FAS2T（nbrp yeast 由来）を用い、同様なセルレニン耐性株（FAS2-1250A、FAS2-1250C、FAS2-1250T）の取得を試みている。これらはガスクロマトグラフィーによるカプロン酸エチルの定量を行い、野生株との比較により高生産株であることを確認する。

(1) 佐伯隆登、仲宗根薫　泡盛酵母の芳香生成及び栄養要求性関連遺伝子群の構造解析、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月（神戸）

awamori yeast, ethyl caproate, FAS2

発表責任者：仲宗根薫（nakasone@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：2A08p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A08 会場

ILV5 高発現によるジアセチル低生産性酵母の育種

Breeding of a low diacetyl producting sake yeast by high expression of *ILV5*

○安川 史織、山口 泰広、砂田 啓輔、山田 翼、末野 和男、田中 伸哉（菊正宗・総研）
○Shiori YASUKAWA, Yasuhiro YAMAGUCHI, Keisuke SUNADA, Tasuku YAMADA, Kazuo SUENO, Nobuchika TANAKA (Kiku-masamune)

【背景・目的】

清酒中の代表的なオフフレーバーの一つにヨーグルト様の香りである「ジアセチル臭」と呼ばれるものがあり、特に低アルコールタイプの清酒を醸造するときに発生しやすい。ジアセチルはピルビン酸からαアセト乳酸合成酵素（ALS）によって生成されるαアセト乳酸が分解されることにより生じる。我々はこれまでに ALS をコードする遺伝子である *ILV2* に変異が入っていると考えられるジアセチル低生産性変異株を取得したが、この変異株は分岐鎖アミノ酸の生合成能力が低いためか、発酵速度が遅いなどの問題点があった[1)]。一方、αアセト乳酸は分岐鎖アミノ酸生合成系の遺伝子 *ILV5* の転写産物によって NADPH 依存的にα,β-ジヒドロキシイソバレレートに変換され、バリンやロイシンの生合成の基質ともなる。そこで、*ILV5* 高発現によりαアセト乳酸を分岐鎖アミノ酸生合成系へ誘導し、ジアセチルの生成が抑えられる変異株の育種を試みることとした。

【方法・結果】

ジアセチルの定量は GC/MS を用いて測定した。また、醪上清を 40℃で 24 時間静置することで、αアセト乳酸をジアセチルに変換し、総ジアセチル量（ジアセチル生成ポテンシャル:DPP）を測定した。このジアセチル生成ポテンシャルは上槽後に発生しうるジアセチルの最大量を示す。

ベクターpGREG504（EUROSCARF 社）に含まれる高発現プロモーターである TEF プロモーターを清酒酵母協会 701 号のウラシル、トリプトファン要求性株である UT-1 株の *ILV5* の開始コドン上流に導入した *ILV5* 高発現株を作成し、清酒小仕込試験を行ったところ、醪中盤の DPP 値は低く推移した。Ilv5p はαアセト乳酸を代謝する他に、ミトコンドリア DNA と結合して安定化に寄与することが知られている。そこで、ミトコンドリア DNA が不安定化する条件下でミトコンドリアが欠失しない変異株ならば *ILV5* が高発現し、DPP が低い可能性があると考え、変異株の取得を試みた。具体的には EMS 処理した酢酸イソアミル高産生酵母 hia1 株を 500μM EtBr を含む YPD 培地で遮光して 1 日培養後、希釈菌体をグリセロール C 源の最小培地に植菌し、EtBr 耐性変異株を 11 株選抜した。小仕込によるスクリーニングを行ったところ、いずれの変異株も親株より DPP が低く、醸造特性を考慮して選抜した変異株 1 株の小仕込試験では、アルコール度数 8-12%程度の時期の DPP が親株の半分以下で推移することが観察され、低アルコールタイプ清酒醸造用のジアセチル低生産性酵母が取得できたと考えられた。

【参考文献】1)山口泰広ら：日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 4F125

Saccharomyces cerevisiae, diacetyl, BCAA synthesis

発表責任者：安川史織（s-yasukawa@kikumasamune.co.jp）

講演番号：2A08p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A08 会場

Solvent assisted stir bar sorptive extraction（SA-SBSE）法による清酒中の Methional 分析
Analysis of Methional in sake by Solvent assisted stir bar sorptive extraction(SA-SBSE) method

○駒越 まるみ[1,2]、磯谷 敦子[1,2]、神田 涼子[1]、久保田 健斗[1,2]、池田 優理子[1]、藤井 力[1]（[1]酒類総研、[2]広島大院・先端研）
○Marumi KOMAGOE[1,2], Atsuko ISOGAI[1,2], Ryoko KANDA[1], Kento KUBOTA[1,2], Yuriko IKEDA[1], Tsutomu FUJII[1]（[1]Natl. Res. Inst. Brew., [2]Hiroshima Univ.）

【背景目的】

ジャガイモ様のにおいと表現される Methional は、ビールの貯蔵劣化やワインの酸化劣化に関与することが報告されている。清酒では、古酒の香りへの関与が報告されているが [1]、全国新酒鑑評会出品酒でも「甘臭・カラメル様」「焦げ臭」の指摘を受けた出品酒に Methional が多い傾向であることが、当研究室のこれまでの検討で示唆されている。Methional は比較的極性が高いため、香気成分を簡便に抽出できる SBSE 法の利用が難しい。一方、最近開発された SA-SBSE 法では極性成分の回収率が大きく向上することが報告されている [2]。そこで本研究では、SA-SBSE 法を用いた Methional の定量方法を確立するとともに、市販清酒や新酒鑑評会出品酒の定量分析を行った。

【方法・結果】

SA-SBSE 法を用いた Methional の定量分析は、Methional-d_3 を使用した内部標準法で行った。また、SA-SBSE 法に用いる Twister の液相の膨潤には、Diisopropyl Ether を使用した。検量線の決定係数は 0.9999 であり、既知濃度試料の繰り返し分析の標準偏差から算出した検出限界は 0.18 μg/L だった。

清酒での Methional の濃度範囲を調査するため、市販の純米酒、吟醸酒等 15 点を試料として、SA-SBSE 法を用いた定量分析を行った。結果、Methional の濃度範囲は、n.d.~15 μg/L となり、報告されている検知閾値である 10 μg/L[1] を超えるものがあった。また、新酒鑑評会出品酒についても、「甘臭・カラメル様」「焦げ臭」「酵母様・粕臭」といったオフフレーバーの指摘を受けた 45 点と、対照として前述の指摘がなかった 6 点を試料とし、定量分析を実施した。その結果、対照からは Metional が検出されなかったが、上記のオフフレーバー指摘酒の濃度は n.d.~3.3 μg/L であり、「焦げ臭」および「酵母様・粕臭」の指摘数と Methional 濃度との間に有意な相関がみられた（$p = 0.05$）。一方、鑑評会出品酒の Methional 濃度は、報告されている検知閾値以下であった。上記のオフフレーバーには共存成分の影響や Methional 以外の成分の関与などの可能性が考えられ、現在検討を行っている。

[1] Isogai, A. et al., J. Agric. Food Chem, 53 (2005), 4118-4123
[2] Ochiai, N. et al., J. Chromatogr. A, 1455 (2016), 45-56

Methional, SA-SBSE, Sake

講演番号：2A08p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 を介したエタノールストレス応答およびエタノール発酵調節
Ethanol stress response and regulation of ethanol fermentation by yeast ubiquitin ligase Rsp5

○松本 拓也、渡辺 大輔、志賀 岳希、北 侑子、アフィア ティラシティヌル、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Takuya MATSUMOTO, Daisuke WATANABE, Takeki SHIGA, Yuko KITA, Tira Siti Nur AFIAH, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、真核生物に広く保存された Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼ Rsp5 が様々な細胞機能に関与することが知られている。我々は以前に、Rsp5 によるユビキチン化のための基質認識に重要な WW ドメイン内にアミノ酸置換を有する Ala401Glu（A401E）機能欠失変異株では、発酵過程において酵母が受ける主要なストレスの一つであるエタノールをはじめ、様々なストレスに対する耐性が低下することを報告している（Hoshikawa *et al.*, *PNAS*, 2003; Shiga *et al.*, *Eukaryot. Cell*, 2014）。そこで本研究では、エタノールストレス応答およびエタノール発酵における Rsp5 の役割を明らかにすることを目的とした。

まず、A401E 変異がエタノール発酵に与える影響を調べるため、高グルコース含有 YPD 培地における発酵速度を解析した。その結果、エタノール耐性が低下する A401E 変異株では、野生型株に比べ発酵速度が顕著に低下していた。Rsp5 の WW ドメインを介した基質認識の多くにおいて、アレスチン様のアダプタータンパク質による仲介が必要であることが知られている。*S. cerevisiae* では 10 種類以上のアダプタータンパク質が存在し、その中でも互いに相同な Bul1 及び Bul2（Bul1/2）または Art1 の機能欠損が、A401E 変異株と同様にエタノール耐性と発酵速度が顕著に低下することを見出した。さらに、A401E 変異は、Rsp5 と Bul1/2 または Art1 との間の相互作用をエタノールストレス非依存的に弱めることも判明した。Rsp5 を介したエタノールストレス応答および発酵調節の標的を明らかにするため、発酵過程における A401E 変異株のメタボローム解析およびエタノールストレス存在下における *ART1* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、A401E 変異株は解糖系の産物であるピルビン酸からエタノールへの変換に欠損を示し、*ART1* 遺伝子破壊株はその代謝反応を触媒する既知のピルビン酸デカルボキシラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼのパラログ遺伝子である *PDC6*, *ADH5* のエタノールストレスに応答した発現誘導に欠損を示すことを見出した。これまで Pdc6 および Adh5 のいずれもマイナーなアイソザイムと考えられており、エタノール発酵への関与は報告されていなかったが、本研究で用いた高グルコース含有 YPD 培地では、*PDC6* または *ADH5* 遺伝子の単独破壊が、主に発酵初期における発酵速度を低下させることが示された。以上の結果から、Pdc6 および Adh5 は高グルコース含有環境において高濃度のエタノールを効率的に生産する上で重要な役割を果たしており、Rsp5 と Bul1/2, Art1 がこれらの発現を正に制御することでエタノール発酵を促進する、という新たな可能性が示唆された。

Rsp5, ethanol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2A08p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母 Greatwall プロテインキナーゼを介した新規アルコール発酵調節経路

Novel alcoholic fermentation control pathway mediated by yeast Greatwall protein kinase

○梶原 拓真[1]、渡辺 大輔[1]、武田 鋼二郎[2]、建部 恒[1]、塩﨑 一裕[1]、高木 博史[1]([1]奈良先端大・バイオ、[2]甲南大・理工)
○Takuma Kajihara[1], Daisuke Watanabe[1], Kojiro Takeda[2], Hisashi Tatebe[1], Kazuhiro Shiozaki[1], Hiroshi Takagi[1] ([1]NAIST, [2]Konan Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるアルコール発酵は、発酵産業に欠かせない有用機能であるが、その人為的な調節は容易ではない。我々は以前に、出芽酵母に属する「きょうかい 7 号(K701)」株に近縁な清酒酵母の高発酵力を生み出す要因として、真核生物に広く保存された Greatwall ファミリープロテインキナーゼ（Gwl）をコードする *RIM15* 遺伝子における機能欠失変異を同定した。しかしながら、清酒酵母において正常な機能を有する *RIM15* 遺伝子を回復させても発酵力が低下しないことから、Rim15p の下流で発酵調節を行う未知の因子の存在が示唆された。そこで本研究では、真核生物に保存された Gwl 下流のシグナル伝達経路がアルコール発酵に及ぼす影響について注目した。

近年の研究により、Gwl は、α-エンドスルフィン（ENSA）のリン酸化を介して、B55δ 結合型プロテインフォスファターゼ 2A（$PP2A^{B55\delta}$）を阻害し、細胞周期調節に関与することが報告されている。そこで、出芽酵母に属する実験室酵母株に加え、進化的にかけ離れた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* も用いて、これらの関連遺伝子欠失株を作製し、高グルコース含有 YPD 培地における発酵速度の解析を実施した。その結果、まず、出芽酵母および分裂酵母のいずれにおいても共通に、ENSA の欠失が Gwl の欠失と同様に、アルコール発酵を促進することを見出した。また、様々な PP2A 複合体に共通する触媒サブユニットや調節サブユニット A の欠損が発酵速度を低下させることも示した。さらに、$PP2A^{B55\delta}$ の機能特異性を生み出す上で重要な役割を果たす調節サブユニット B（B55δ）の欠失は発酵速度を顕著に減少させ、Gwl や ENSA の欠失と組み合わせると高発酵に関する表現型がほぼ完全に無効となった。以上の結果から、本研究で着目した Gwl-ENSA- $PP2A^{B55\delta}$ 経路が、出芽酵母と分裂酵母の両方において発酵調節に重要な役割を果たしているという新規な知見を得ることができた。$PP2A^{B55\delta}$ とは異なる PP2A 複合体に含まれる調節サブユニット B’の欠損は発酵速度を上昇させたことから、PP2A 複合体による発酵調節は B55δ 結合型に特異的であり、調節サブユニット B と B’が PP2A 複合体の機能をめぐって競合している可能性も示唆された。

最後に、$PP2A^{B55\delta}$ が清酒酵母の高発酵力に貢献しているのかどうかを明らかにするため、清酒酵母 K701 株の $PP2A^{B55\delta}$ 調節サブユニット B 欠失株を構築し、発酵試験を行った。その結果、高発酵に関する表現型は顕著に打ち消された。したがって、清酒酵母では、Rim15p の欠損に加え、何らかの独立した原因により $PP2A^{B55\delta}$ の活性が亢進されており、そのことが清酒酵母の高発酵性を生み出すより根源的な原因である可能性が見出された。

$PP2A^{B55\delta}$, Greatwall, Alcoholic fermentation

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2A08p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母のアルコール発酵調節における TORC1 シグナリングとアミノ酸の効果
Effects of TORC1 signaling and amino acids in the control of alcoholic fermentation of yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○渡辺 大輔[1,2]、杉本 幸子[1]、水野 恵[2]、周 延[2]、陳 佳文[3]、赤尾 健[2]、下飯 仁[2,4]、前田 達哉[3]、高木 博史[1]([1]奈良先端大・バイオ、[2]酒総研、[3]東京大・分生研、[4]岩手大・農)
○Daisuke WATANABE[1,2], Yukiko SUGIMOTO[1], Megumi MIZUNO[2], Yan ZHOU[2], Jiawen CHEN[3], Takeshi AKAO[2], Hitoshi SHIMOI[2,4], Tatsuya MAEDA[3], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]NAIST, [2]NRIB, [3]Univ. Tokyo, [4]Iwate Univ.)

清酒酵母の高発酵力原因変異の探索により同定された発酵抑制因子 Rim15p プロテインキナーゼは、グルコースおよび窒素源によりそれぞれ活性化された PKA、TORC1 により機能を阻害されることが報告されている。また、我々は以前に、Rim15p の下流において、UDP-グルコースピロフォスフォリラーゼをコードする *UGP1* 遺伝子の発現が誘導され、炭素同化に影響を及ぼすことを報告している。しかしながら、窒素源に端を発するシグナルがアルコール発酵にどのように作用するのかについての詳細は不明である。そこで本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における TORC1 を介した代謝調節に着目し、発酵調節における TORC1 シグナリングの意義の解明を目的とした。

まず、高グルコース含有 YPD 培地を用いた発酵試験において、TORC1 の阻害剤として知られるラパマイシンの添加や TORC1 の触媒サブユニットである Tor1p および Tor2p の高活性型変異の影響を解析した結果、TORC1 活性がアルコール発酵を正に制御していることが見出された。TORC1 の主要な標的である Sch9p の抗リン酸化型抗体を用いて TORC1 活性を解析した結果、さかんなアルコール発酵を示す発酵初期の細胞において高い活性が認められた。次に、TORC1 の下流因子が発酵力に及ぼす影響を調べた結果、Rim15p の欠損だけでなく、アミノ酸の生合成や細胞外からの取込みに関連する遺伝子の発現誘導において中心的な役割を果たす転写因子 Gcn4p、Gln3p、Gat1p の機能欠損も有意に発酵力を低下させることが明らかになった。これらの因子は、窒素源の枯渇時にのみ活性化すると考えられてきたが、我々の研究により、豊富な窒素源を含む発酵環境下においても活性化し発酵調節に貢献する、という新たな可能性が示唆された。それでは、これらの転写因子はどのようにしてアルコール発酵を抑制するのだろうか？Gcn4p、Gln3p、Gat1p は *UGP1* 遺伝子のプロモータ領域に結合配列を有さないことから、既知の機能であるアミノ酸の生合成・取込みの関与を調べた。α-ケトグルタル酸とアンモニアからグルタミン酸を合成するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ Gdh1p および Gdh3p は、アミノ酸合成に必須であり、炭素代謝と窒素代謝のバランスを保つ上でも重要であるが、その欠損により発酵速度は上昇した。さらに、アミノ酸パーミアーゼ Gap1p のユビキチン化部位の改変により恒常的にアミノ酸を取り込む変異株では、環境中のアミノ酸の添加に応じて発酵速度が低下することも示した。なお、Tor1p の高活性型変異は発酵過程における細胞内アミノ酸含量を低下させたのに対し、Rim15p はほとんど影響を及ぼさなかった。以上の結果から、TORC1 により調節を受けるアミノ酸の生合成・取込み自身が、Rim15p 経路とは独立にアルコール発酵を抑制する、という結論が導き出された。

alcoholic fermentation, TORC1, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2A08p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A08 会場

清酒もろみにおける酵母ヘキソーストランスポーターHxt1 および Hxt3 の局在性の解析

Analysis of localization of yeast hexose transporter Hxt1 and Hxt3 in sake mash

○渡部 保容、山田 美和、下飯 仁（岩手大院・農）
○Yasutaka WATANABE, Miwa YAMADA, Hitoshi SHIMOI (Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はヘキソーストランスポーター(Hxt)を介して細胞内にグルコースを取込み、エタノール発酵を行う。そのため、Hxt の活性はエタノール発酵全体に大きな影響を与えると考えられている。酵母は異なるグルコース親和性を持つ多種類の *HXT* 遺伝子を持っているが、その中から環境中のグルコース濃度に応じて適切な Hxt を発現して細胞膜に局在化させ、不要になると液胞に輸送して分解する。グルコースが豊富に存在する清酒醸造環境では、低親和性 Hxt（Hxt1 および Hxt3）が発現していると考えられるが、それらの動態は明らかではない。そこで、清酒醸造環境下での Hxt1 および Hxt3 の挙動を調べるために、Hxt1 および Hxt3 に蛍光タンパク（GFP）を融合した清酒酵母を作成して、小仕込試験を実施し、Hxt1-GFP と Hxt3-GFP の局在性変化を観察した。また、実験室酵母および実験室酵母の高発酵性変異株である *RIM15* 破壊株についても同様の実験を行い、3 株間の Hxt1-GFP および Hxt3-GFP の局在性の違いを比較した。

【方法および結果】

清酒酵母 K7、実験室酵母 BY4743、実験室酵母 *RIM15* 破壊株の *HXT1-GFP* 融合株および *HXT3-GFP* 融合株を染色体組込型プラスミドの形質転換により取得した。形質転換体を用いた総米 100 g の清酒小仕込試験を行い、経時的にもろみをサンプリングして蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、清酒酵母の Hxt1-GFP は発酵中期でも細胞膜に局在していたのに対し、実験室酵母および実験室酵母 *RIM15* 破壊株の Hxt1-GFP は発酵初期に細胞膜から消失した。一方、Hxt3-GFP については、清酒酵母および実験室酵母では日数経過に伴って細胞膜での蛍光が弱化したが、実験室酵母 *RIM15* 破壊株では発酵終了まで細胞膜での蛍光が維持されていた。清酒酵母は実験室酵母よりも清酒もろみにおいて高濃度のエタノールを生産するが、*RIM15* などのストレス応答関連遺伝子に機能欠損変異があり、実験室酵母の *RIM15* を破壊すると清酒酵母に匹敵するエタノール生産力を示すことが知られている。今回の結果からは、清酒酵母と実験室酵母 *RIM15* 破壊株は同程度の高い発酵力を示すものの、Hxt の挙動は異なることが明らかとなった。現在は醸造環境中に存在すると考えられるストレス（エタノール、栄養飢餓等）を個別に与えた際の Hxt 局在性変化を観察している。

Sake yeast, Hexose transporter, GFP

発表責任者：下飯　仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2A08p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A08 会場

清酒酵母を特徴づける転写因子の探索と解析

The screening and analysis of transcription factor determining characteristics of sake yeast

○桑山 翔一、山元 翔太、人見 啓介、鹿島 舞央、門倉 利守、鈴木 健一朗、中山 俊一（東農大・院・醸造）
○Shoichi KUWAYAMA, Shota YAMAMOTO, Keisuke HITOMI, Mao KASHIMA, Toshimori KADOKURA, Kenichiro SUZUKI, Syunichi NAKAYAMA (Tokyo Univ of Agriculture)

【目的】清酒醸造に用いられる清酒酵母は、他の醸造酵母と比べて低温生育能やアルコール発酵能など異なる性質を有することが知られており、これら清酒酵母を特徴づける様々な遺伝子が報告されている。これらの遺伝子発現は核内における転写因子等によって制御されることから、核内のタンパク質を比較することで清酒酵母の特徴を引き出す制御機構を明らかにすることが期待される。そこで、本研究では清酒酵母と実験室酵母において核タンパク質の発現量を網羅的に比較し、発現量に差のある転写因子を探索するとともにその転写因子が生育能や発酵能に与える影響を調べることを目的とした。
【方法・結果】清酒酵母 K901 と二倍体の実験室酵母 BY4743 に *URA3* 遺伝子を導入した BY4743U を用いた。これら2つの株を YM10 培地にて 24h 培養後ホモジナイザーによる酵母破砕の後、遠心分離により核を分画し核タンパク質画分を取得した。これら核タンパク質画分を 2 次元電気泳動に供した結果、約 60 スポットの内 K901 のみに見られるスポットは 9 つ、BY4743U のみに見られるスポットは 5 つ、スポットがシフトしたものは 1 つ見られ、K901 と BY4743U では核タンパク質の発現パターンが異なることが示唆された。そこで、iTRAQ 試薬を用いた網羅的なタンパク質発現解析を行ったところ、K901 で 2 倍以上発現量が増加した転写因子を 5 つ、50%以下に減少した転写因子を 5 つ見出した。中でも糖新生や呼吸に関与する遺伝子発現を制御する RDS2 の発現量が K901 では BY4743U と比べて 34 倍高かった。そこで、新規に取得した K701 の一倍体 H3(MATalpha)と H12(MATa)においてオーレオバシジン耐性遺伝子を用いた相同組み換えにより *RDS2* 遺伝子破壊株を取得した後、接合によって二倍体 *RDS2* 遺伝子破壊株を取得した。グルコース 10%を炭素源とする YM10 培地にて 30°C にて培養したところ、*RDS2* 破壊株は親株と比較し培養 72 時間後の OD_{660nm} が 38%低下した。また、20 °C で培養した際も *RDS2* 破壊株では生育能が低下した。一方、エタノールを唯一の炭素源とする YPE 培地にて培養したところ生育能は変化しなかった。この事から、清酒酵母の高い生育能には RDS2 の発現量が関与することが示唆された。

sake yeast, transcription factor, growth

講演番号：2A08p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A08 会場

次世代酒米を用いた試験醸造酒の成分分析および官能評価とメタボライトの関係
Component analysis and quality prediction of sake made from new breeds of sake rice
○小林 拓嗣[1]、平田 章悟[1,2]、畑 夕子[1]、熊崎 努[1]、森川 佳奈[1]、水上 留以[1]、齊藤 亮太[1]、矢澤 彌[1]、岩下 和裕[1,2] ([1]酒類総合研究所、[2]広島大院先端)
○ Takuji KOBAYASHI[1], Shogo HIRATA[1,2], Yuko HATA[1], Tsutomu KUMAZAKI[1], Kana MORIKAWA[1], Rui MINAKAMI[1], Ryota SAITO[1], Hisashi YAZAWA[1], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]National Research Institute of Brewing, [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】 我々は、酒米新品種である兵庫錦や兵系酒 85 号、石川酒 68 号、栃木酒 27 号と親品種である山田錦について、原料米特性と醸造特性の比較試験を行っている。これまでに、酒米統一分析や小仕込み試験の結果、栽培条件等の違い以上に品種間に違いがあることが分かってきた。そこで、今回は、個々の醸造条件が異なる実製造条件での清酒の成分および官能特性を把握することを目的として、上記の酒米新品種を用い、種々の製造場のプラントで醸成された試験醸造酒について成分分析や官能評価により評価した。さらに、メタボローム解析の結果から官能評価スコアを予測するモデルを構築し、官能評価結果に重要な化合物を明らかにすることを目指した。
【方法】 山田錦と上記 4 品種に祝、京の輝きを加えた 7 品種を用いて、各府県の製造場など計 12 カ所で醸成された試験醸造酒 26 点の一般成分、香気成分、UPLC-Q Tof MS によるメタボローム分析を実施した。さらに、19 人の評価者により定量的記述分析法 (QDA 法) による官能評価を行った。吟醸香や味の濃淡など 13 の評価項目について評価を行ない、分散分析により有意差が認められた評価項目を目的変数、メタボローム分析で検出されたマーカー強度を説明変数として orthogonal projections to latent structures (OPLS) 回帰分析を行い、官能評価スコアに重要なマーカーを選択した。
【結果】 一般成分、香気成分、メタボローム分析の分析値を主成分分析により解析した結果、おおむね酒米新品種ごとに分かれてプロットされたことから、製造条件が異なる試験醸造酒においても品種間の違いが示唆された。官能評価の結果、評価項目のうち吟醸香、老香、生老香、木香様臭、ジアセチル、甘味、酸味、濃淡、苦味、エグ味、あと味、総合評価は分散分析で有意差があり、試験醸造酒ごとの特徴を定量的に評価できたことを確認した。これらの官能評価スコアを主成分分析により解析したところ、酒米新品種のプロットは異なるグループに分けられ、成分分析の結果と同様に品種間の違いが示唆された。この結果から、官能評価の差がメタボローム解析により説明できると考え、OPLS 解析を行った。その結果、全マーカー 4,866 個の中から評価項目ごとに 74～96 個のマーカーが官能評価スコアに重要なものとして選択された。この中には、例えば、甘味ではグルコース、苦味ではチロソールやフェルラ酸などの官能評価との関係が既知の物質のみならず、未同定成分も含まれていた。今回の解析で、成分分析や官能評価により、実製造レベルでも酒米新品種間に違いがあることやその差を化合物単位で示すことが出来た。今後、各官能評価スコアに重要な化合物について、さらなる解析を行っていきたい。

sake, metabolome, sensory analysis

発表責任者：岩下和裕（iwashitact@nrib.go.jp）

講演番号：2A08p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A08 会場

酒造好適米兵庫恋錦を用いた清酒の特徴

Characteristics of the sake brewed with sake-brewing rice *Hyogo-koinishiki*

○高尾 佳史、山田 翼、末野 和男、田中 伸哉（菊正宗・総研）
○Yoshifumi TAKAO, Tasuku YAMADA, Kazuo SUENO, Nobuchika TANAKA (Kiku-masamune)

【目的】

清酒醸造においては山田錦をはじめとした酒造好適米が多く使用されている。酒造好適米の一つである兵庫恋錦は山田錦と I.M.106 を交配させて兵庫県立農業試験場で育成されたものであり、山田錦に比べて早生で耐倒伏性が高いこと、多収であること、大粒で心白の発生が多いことなどが特徴として挙げられる。しかし、米粒が柔らかく、無効精米歩合が高いことなどから現在ではほとんど使用されていない。一方、菊正宗酒造では三木市吉川町の農家と契約栽培した兵庫恋錦を使用して清酒醸造を行っている。兵庫恋錦の特徴や兵庫恋錦を使用した清酒の特徴を明らかにすることを目的として試験を行った。

【方法】

精米歩合 60%の兵庫恋錦もしくは山田錦を用いて清酒を醸造し、これらの官能評価、一般分析、メタボローム解析を行った。また、米自体に関してもグレインスキャナーによる解析やメタボローム解析を行った。

【結果】

グレインスキャナーなどを用いた解析の結果、これまでに報告されている通り、兵庫恋錦は山田錦に比べて幅が広く、長さが短く、厚みが厚くなっていた。特に厚みは山田錦に比べて 13%ほど厚くなっており、兵庫恋錦はより球に近い形状をしていることが分かった。また、兵庫恋錦では山田錦に比べて心白発現率も高かった。

清酒の官能評価の結果、総合評価では兵庫恋錦の評価が有意に高かったが、他では有意な差は見られなかった。これまでの経験上、兵庫恋錦の清酒の特徴であると考えられた甘味に関しては、兵庫恋錦で甘味が強い傾向が確認された。一般分析の結果には大きな差は見られなかった。さらに、清酒のメタボローム解析を行ったところ、PLS 判別分析により、兵庫恋錦の判別に寄与する成分として多くの糖類が検出された。これらの結果より、兵庫恋錦で醸造した清酒の特徴の一つは甘味であり、その甘味の一部は米由来の成分によると考えられた。

sake-brewing rice, Japanese sake, taste

発表責任者：高尾佳史（y-takao@kikumasamune.co.jp）

講演番号：2A08p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A08 会場

米グルテリンファミリーの米粒内局在に関する研究

Expression pattern and localization of glutelin family in rice grain

○高橋 圭、河野 弘美、奥田 将生（酒類総合研究所）
○Kei Takahashi, Hiromi Kohno, Masaki Okuda (NRIB)

【背景と目的】 清酒は、ビールやワインと比べて、ジペプチド・トリペプチドを中心に様々な低分子オリゴペプチドを豊富に含んでいる(文献 1)。清酒は並行複発酵の様式をとるため、麹菌由来のプロテアーゼ等のタンパク質分解酵素の作用がもろみ後期まで続き、清酒には豊富な低分子オリゴペプチドが含まれるようになると考えられ、同じ醸造酒であるビールやワインには無い、清酒の一つの特徴となっている。近年、吟醸酒の一部の低分子オリゴペプチドが吟醸酒の品質と相関することが分かってきている(文献 2、3)ことからも、清酒の低分子オリゴペプチドの生成機構の解明は重要である。

清酒の低分子オリゴペプチドは、米グルテリンのアミノ酸配列を反映すると示唆されている(文献 1)。米グルテリンは、米タンパク質総量の約半分を占め、タンパク質分解酵素による作用を受けやすい性質から、清酒の低分子オリゴペプチド組成・濃度に大きく影響すると考えられる。そのため、清酒の低分子オリゴペプチドを理解するためには、米グルテリンについて詳しく解析する必要がある。グルテリンは、15 の遺伝子から成るが、うち12 の遺伝子が酸性サブユニットと塩基性サブユニットの両方を有するフルサイズで発現すると考えられており、4つのサブファミリーに分かれている。米グルテリンサブファミリーごとの米粒内における発現場所が分かれば、精米の影響や清酒のオリゴペプチド生成に関する深い理解が得られることから、本研究では、米グルテリンタンパク質についてサブファミリーごとの米粒内局在について明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 5種類のグルテリン(GluA, GluB-1, GluB-4/5, GluC-1, GluD)の酸性サブユニット可変領域に対する抗体を作成し、大腸菌に強制発現させたグルテリン酸性サブユニットに対するそれぞれの抗体特異性を確認した。米粒の外側から内側まで4つに分画した米粉末からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 後、抗グルテリン抗体を用いたイムノブロットにより発現を解析した。また、登熟中のイネの未成熟米について、免疫蛍光染色により米粒内の局在を解析した。その結果、グルテリンサブタイプによって米粒内の蓄積場所が異なることが分かった。

【参考文献】

1：Journal of Chromatography A 1242, 17-25 (2012)
2：Journal of Bioscience and Bioengineering 121, 274-280 (2016)
3：PLOS ONE 11(3): e0150524 (2016)

Rice grain, Glutelin, Localization

発表責任者：高橋　圭（k.takahashi@nrib.go.jp）

講演番号：2A08p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A08 会場

分裂酵母のエルゴステロール生合成遺伝子の発現調節によるスクワレンの蓄積促進

The promotion of squalene accumulation by regulating expression of ergosterol biosynthetic gene in fission yeast

○飯沼 夏生[1]、齋藤 直也[2]、八代田 陽子[3,4]、吉田 稔[3,4]、浜本 牧子[1,2]([1]明治大学院・農、[2]明治大学・農、[3]理研・化学遺伝、[4]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス)
○Natsumi Iinuma[1], Naoya Saito[2], Yoko Yashiroda[3,4], Minoru Yoshida[3,4], Makiko Hamamoto[1,2]([1]Meiji Univ.Grad. Sch., [2]Meiji Univ., [3]Chem Genet RIKEN, [4]Chem Genomics RIKEN CSRS)

【目的】スクワレンはトリテルペンの１つで、酵母の細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成経路の中間体として生成される。サメ類の肝油に多く含まれており、水素添加したスクワランは潤滑油や皮膚の保湿剤などに利用されている。本研究では酵母によるスクワレン生産系構築を目的として、分裂酵母のエルゴステロール生合成遺伝子の発現調節によるスクワレンの蓄積について調べた。

【方法】分裂酵母のエルゴステロール生合成遺伝子の中から PomBase（http://www.pombase.org）の情報に基づいて選抜した3遺伝子（*hmg1*、*erg1* 及び *erg9*）について Gateway®テクノロジーにより目的遺伝子の過剰発現または（／及び）発現抑制株を作製し、遺伝子発現条件下で培養した菌体をスクワレン定量に供した。スクワレンの定量は、全菌体から Bligh-Dyer 法で抽出した脂質をけん化後、ヘキサン抽出し、GC-MS 分析により行った。

【結果】エルゴステロール生合成の律速酵素 HMG-CoA レダクターゼ遺伝子 *hmg1* の二重過剰発現株において、スクワレンの細胞内蓄積量が顕著に増大した。スクワレン蓄積量に及ぼす培養条件の影響を調べた結果、培養 144 時間で最大蓄積量となった。培地へのロイシン添加による細胞内スクワレン蓄積量の変化についても報告する。

Fission yeast, Squalene, Ergosterol

講演番号：2A08p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A08 会場

Yeast strains isolated from Sri Lanka show higher tolerance to inhibitors derived from hydrolysis of lignocellulosic materials

○Maduka Subodinee Ahangangoda Arachchige[1], Osamu Mizutani[2], Hirohide Toyama[1,2] ([1]United graduate school of Agriculture, Kagoshima Univ., [2]Univ. Ryukyus)

[Objective] We isolated the 18 strains of *Saccharomyces cerevisiae* from coconut toddy in Sri Lanka. Five strains (SLY-3, SLY-4, SLY-8, SLY-9, and SLY-10) were selected based on salt tolerance, thermotolerance, and productivity of alcohol at high temperatures. Here, we investigated the effect of inhibitors derived from hydrolysis of lignocellulosic materials including vanillin on growth and alcohol fermentation.

[Methods] We examined vanillin at first. The culture supernatants supplemented with 3 to 21 mM vanillin from SLY-10 strain grown at 30℃ were analyzed by HPLC. The gradient of acetonitrile to the MiliQ water was used as mobile phase. Peaks were detected with absorption at 280 nm. The fermentation ability of five yeast strains in the presence of inhibitor cocktail containing acetic acid, formic acid, furfural, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, and vanillin to the YPD (100 g/L glucose) was investigated at 30℃ under static condition. Alcohol samples were collected and alcohol quantification was carried out by using Alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme from acetic acid bacteria.

[Results] *S. cerevisiae* SLY-10 strain is found to show the highest tolerance to vanillin. By the strain, vanillin is converted to vanillyl alcohol during the lag or exponential phase, and after the vanillin concentration is lowered to non-toxic level, the yeast cells start to grow. With the inhibitor cocktail, we observed that fermentation ability of all five strains was synergistically reduced by combined inhibitors. In fact, all five strains produced lower in alcohol concentration with the inhibitor cocktail and they showed normal alcohol production with each inhibitor alone as well as without inhibitors.

Saccharomyces cerevisiae, Vanillin, Alcohol fermentation

講演番号：2A08p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A08 会場

Characterization of fatty acid profile and gene expression of fatty acid desaturases at high temperature in thermotolerant isolated from *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16

○Chih chan WU[1], Takao OHASHI[1], Yung Yu TSAI[1], Ryo MISAKI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

Oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 (TK16) which was isolated from Thailand, was proven to be able to accumulate lipid content up to nearly 70% of dry cell weight in cell. Due to its outstanding lipid producing ability, TK16 is considered to be an ideal platform for lipid production toward biofuel industry. In order to improve the thermotolerance for producing lipids at high temperature, we isolated one of the mutants, called L1-1, showing better growth and higher lipid production at 37°C. The thermotolerant L1-1 was found to have significantly higher oleic acid (C18:1) content and lower linoleic acid (C18:2) than wild-type TK16 at 37°C. In yeast cells, Δ9 desaturase catalyzes the production of oleic acid (C18:1) and Δ12 desaturase catalyzes the conversion of oleic acid (C18:1) to linoleic acid (C18:2). In this study, we examined the expression levels of *Δ9 desaturase* and *Δ12 desaturase* genes in the thermotolerant L1-1 by real-time PCR to elucidate the mechanism of the synthesis of C18 fatty acids in L1-1 at 37°C. The results showed that the gene expression levels of these two genes in L1-1 were higher than wild-type TK16. Besides, the gene expression level of *Δ9 desaturase* and *Δ12 desaturase* were further induced while cultivated at 37°C in comparison to 30°C. Notably, although the *Δ12 desaturase* gene expression level was increased at 37°C, the decrease of oleic acid and increase of linoleic acid were not observed. Although the underlying mechanism is needed to be unveiled, the thermotolerant strain L1-1 may be a suitable model for studying the synthesis pathway of C18 fatty acids at high temperature. The information may provide new clues for engineering lipid production or studying the thermotolerance in *R. toruloides*.

Rhodosporidium toruloides, thermotolerant, fatty acid profile

発表責任者：Fujiyama Kazuhito（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A08p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A08 会場

Enhanced oleic acid content and lipid productivity by overexpressing delta9-fatty acid desaturase gene in the oleaginous yeast, Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16 for designed biodiesel production.

○Yung-Yu TSAI[1], Takao OHASHI[1], Chih-Chan WU[1], Ryo MISAKI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

Rhodosporidium toruloides is a potential microbial-based platform for lipid production as the alternative source of biofuel or chemical feedstocks, but yet the limited understanding of genetic utilization and manipulating system has confined its further study and application in practice since the last few decades. Besides, the quality of biodiesel is inconstant in *R. toruloides* from different culturing conditions and therefore the system to give designable lipid profile has become an essential object. In order to genetically modify *R. toruloides* strains for biodiesel production with the desired performance, we previously developed a lithium acetate based transformation system[1)]. While, as previous studies have suggested that the enrichment of oleic acid (OA) by over 60% of proportion in fuel providing improved biodiesel properties, a newly isolated *R. toruloides* strain DMKU3-TK16 (TK16) was thus applied for the production of OA-enriched lipid. *Saccharomyces cerevisiae OLE1* (*ScOLE1*) gene encodes stearoyl-CoA desaturase to catalyze stearic acid (C18; STA) for yielding oleic acid (C18:1; OA). To improve OA production in TK16, *ScOLE1* gene and the putative *delta9-fatty acid desaturase* (*RtΔ9-FAD*) gene from *R. toruloides* NP11 were cloned. The functions of *ScOLE1* and *RtΔ9-FAD* genes were examined by complementary test to rescue the survival of *S. cerevisiae* strain BY4389 (*MATa, ole1Δ::LEU2, ura3-52, his4*) with the deficiency of oleic acid. Meanwhile, we successfully overexpressed *ScOLE1* and *RtΔ9-FAD* to gain higher OA content in TK16 transformants by the proportion over 60% in total lipid, while, the transformants also provided higher lipid productivity compared with wild type TK16. Also, larger size and different shape of cells were found from transformants under microscopy observation. Overall, the overexpression of *ScOLE1* and *RtΔ9-FAD* in TK16 could supply OA-enriched lipid as a suitable source of designed biodiesel.

R. toruloides, oleic acid, biodiesel

発表責任者：Fujiyama Kazuhito（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A08p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A08 会場

流加培養した醸造用酵母の特性解析および醸造特性改善
Characteristic analysis and improvement of brewing characteristic of fed-batch cultured brewer's yeast

○藤原 広樹[1]、吉﨑 成洋[2]、北垣 浩志[3]、善本 裕之[4]([1]キリン・ワイン技術研究所、[2]キリンビール・仙台工場、[3]佐大農、[4]キリン・酒類技術研究所)
○Hiroki FUJIWARA[1], Shigehiro YOSHIZAKI[2], Hiroshi KITAGAKI[3], Hiroyuki YOSHIMOTO[4] ([1]Research Laboratories for Wine Technologies, Kirin Co., Ltd., [2]Sendai Brewery, Kirin Brewery Co., Ltd., [3]Saga Univ., [4]Research Laboratories for Alcoholic Beverage Technologies, Kirin Co., Ltd.)

【背景・目的】
多様化する消費者の嗜好に応えるために、多種の酵母株を製造現場で使用できるシステムの構築が必要である。そこで我々は、パン酵母で代表的に使用されている流加培養法を醸造用酵母へ応用することで、効率的かつフレキシブルな培養技術の開発を行なってきた。
これまでの検討から、流加培養した醸造用酵母で発酵を行なった場合、ビール発酵液から回収した酵母（連用酵母）と比較して、酸味・渋味の原因となるコハク酸の生成量が多くなることが分かってきた。コハク酸の生成には TCA 回路やグリオキシル酸回路が寄与していることが報告されており、これらの経路には主にミトコンドリア局在の酵素が関与することから、好気的環境で増殖した流加培養酵母では、発酵工程においてもミトコンドリアの活性が残存している可能性が考えられた。
本研究では、流加培養酵母と連用酵母の差異を明らかにし、流加培養酵母のコハク酸生成量を低減する方法を探索することを目的とした。
【方法】
流加培養酵母と連用酵母を、ミトコンドリア膜電位依存的蛍光色素を用いた蛍光顕微鏡観察、およびマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析に供した。また、流加培養酵母を、高糖濃度を維持しながら好気条件下にて 16 時間培養し、発酵工程でのコハク酸生成量への影響を調べた。
【結果と考察】
流加培養酵母はミトコンドリア膜電位差が大きく、ミトコンドリアの代謝が活性化していることが明らかになった。また、流加培養酵母は TCA 回路やグリオキシル酸回路に関与する酵素をコードする遺伝子の発現量が高く、これらの回路の代謝が活性化していることが示唆された。以上の結果から、流加培養酵母のコハク酸生成量が多い原因は、TCA 回路やグリオキシル酸回路に関わるミトコンドリア局在酵素による代謝が活性化しているためであると考えられた。
流加培養酵母を、高糖濃度を維持しながら好気条件にて培養した結果、発酵工程でのコハク酸生成量が低減することが分かった。Saccharomyces 属などの Crabtree-positive な酵母は、十分な溶存酸素存在下においても高糖濃度条件下で好気呼吸が抑制されることが知られている。このことから、今回の試験条件で流加培養酵母のコハク酸生成量が低減したのは、Crabtree 効果により好気呼吸が抑制された状態で酵母が増殖し、１細胞あたりのミトコンドリア量が減少したためと推察された。

fed-batch culture, mitochondria, succinic acid

発表責任者：藤原 広樹（Hiroki_1_Fujiwara@kirin.co.jp）

講演番号：2A08p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A08 会場

流加培養条件下における酵母のコハク酸生成メカニズムの解析

Analysis of the mechanism of synthesis of succinate by yeast grown in fed-batch culture

門脇 真史[1]、藤原 広樹[2]、藤丸 裕貴[1]、山本 裕貴[1]、吉﨑 成洋[3]、善本 裕之[4]、○北垣 浩志[1]([1]佐大農、[2]キリン・ワイン技術研究所、[3]キリンビール・仙台工場、[4]キリン・酒類技術研究所)
Masafumi Kadowaki[1], Hiroki Fujiwara[2], Yuki Fujimaru[1], Yuki Yamamoto[1], Shigehiro Yoshizaki[3], Hiroyuki Yoshimoto[4], ○Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga Univ., [2]Research Laboratories for Wine Technologies, Kirin Co., Ltd., [3]Sendai Brewery, Kirin Brewery Co., Ltd., [4]Research Laboratories for Alcoholic Beverage Technologies, Kirin Co., Ltd.)

【背景・目的】

ミトコンドリアは酸素に電子を受け渡す電子伝達系を司る細胞内小器官であるが、酸素のないアルコール発酵においても活性が残存し[1)]、有機酸生成[2)]や脂肪酸代謝[3)]などにおいて醸造上で重要な役割を持つことが明らかになりつつある。ミトコンドリア内、もしくはミトコンドリア外の代謝に影響を与えて有機酸を生じる経路には、TCA 回路とグリオキシル酸回路の存在が知られている。

我々は、より効率的でフレキシブルな醸造用酵母の培養システムを構築するために、パン酵母で代表的に使用されている流加培養システムを醸造用酵母へ応用することに取り組んでいる。流加培養した醸造用酵母で発酵を行なった場合、酸味・渋味の原因となるコハク酸が多くなる課題が発生し、どの生成経路でコハク酸が生成するかを明らかにする必要があった。しかし、流加培養条件下で TCA 回路とグリオキシル酸回路のどちらの経路がどの程度有機酸生成に寄与するかについての知見はこれまでなかった。

【方法】

流加培養条件下において TCA 回路とグリオキシル酸回路のどちらがどれくらい寄与しているかを調べるため、TCA 回路とグリオキシル酸回路の実験室酵母遺伝子破壊株を用いて流加培養を行い、その有機酸組成を解析した。

【結果と考察】

TCA 回路の遺伝子破壊株酵母を流加培養で増殖させ、発酵させた発酵液ではコハク酸、リンゴ酸、クエン酸が大きく減少し、流加培養条件下では TCA 回路がこれらの有機酸の生成に主に寄与していることがわかった。一方、グリオキシル酸回路の遺伝子破壊株酵母を流加培養で増殖させ、発酵させた発酵液ではコハク酸は有意に変化していなかった。これらの結果は、流加培養条件下において、コハク酸は主に TCA 回路で生成されていることを示唆した。

以上より、流加培養条件下において、酸味・渋味の原因となるコハク酸濃度が高くなる課題は、TCA 回路が主に寄与していることが明らかになった。

1) Applied and Environmental Microbiology, 80 (3), 1002–1012 (2014)
2) Journal of the Institute of Brewing, 118, 22–26 (2012)
3) PeerJ, 4, 1522 (2016)

fed-batch culture, beer, yeast

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2A08p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A08 会場

高リンゴ酸低酢酸生産性変異株におけるグリセロール代謝が有機酸生成に及ぼす影響

The effect of glycerol metabolism on organic acids production mechanism in sake yeast mutant

○西村 友里[1]、山元 翔太[1]、久保田 恵理[2]、兼崎 友[2]、鈴木 健一朗[1]、門倉 利守[1]、中山 俊一[1] ([1]東農大・院・醸造、[2]東農大・ゲノムセ)
○Yuri NISHIMURA[1], Shota YAMAMOTO[1], Eri KUBOTA[2], Yu KANESAKI[2], Kenichiro SUZUKI[1], Toshimori KADOKURA[1], Shunichi NAKAYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Aguriculture, [2]Tokyo Univ. of Aguriculture genome ce.)

【目的】呼吸阻害剤である 2,4‐dinitrophenol(DNP)耐性を指標として取得された高リンゴ酸・低酢酸生産性を示す DNPR38 はグルコース 10%を含む YM 培地(YM10)において親株である清酒酵母 K901 に比べてリンゴ酸生成量が 3.3 倍に増加し、酢酸生成量が 30%に減少する。さらに、DNPR38 のグリセロール生成量は親株よりも 33%減少する。リンゴ酸生成とグリセロール生成時には NADH を、酢酸生成とグリセロール分解時には NAD^+を必要とすることから DNPR38 における有機酸生成機構には酸化還元が関与することが示唆される。そこで本研究では、DNPR38 のグリセロール代謝に関する遺伝子破壊等によりグリセロール代謝と有機酸生成の関連性について調べた。
【方法・結果】K901 と DNPR38 を YM10 培地にて培養し、12h 毎にサンプリングした。上清から発酵産物を測定し、菌体から RNA を抽出後 RNA-seq 法により網羅的に転写解析した。DNPR38 においてはグリセロール生成量が減少していることからグリセロール生合成遺伝子の転写量が低下していることが予想されたが、予想に反して glycerol-3-phosphate dehydrogenase(*GPD1*)と glycerol-3-phosphate phosphatase(*GPP2*)の DNPR38 における転写量は培養 48 時間まで親株よりも 2 倍以上高かった。このことは本来生合成を担う *GPD1* と *GPP2* が逆反応によりグリセロールを分解する可能性も考えられたが、DNPR38 において *GPD1* 遺伝子を破壊したところ、グリセロール生成量はさらに 12%減少し、それに伴いリンゴ酸生成量が 1.5 倍増加し、酢酸生成量が 30%低下した。このことは、NADH を利用する *GPD1* を破壊したことで細胞内がより還元状態となり、高リンゴ酸・低酢酸生成となったと考えられた。つまり、DNPR38 はグリセロール生合成能が低下したのではなく、グリセロール分解が活発になっている可能性が示唆された。そこで、グリセロール代謝を担う glycerol dehydrogenase と dihydroxyacetone kinase の酵素活性を測定したところ、DNPR38 の glycerol dehydrogenase 活性は親株と同程度であったのに対して、dihydroxyacetone kinase 活性は親株より約 2 倍増加していた。グリセロール代謝時は NADH の生成を伴うことから、グリセロール代謝能が高まったことで細胞内がより還元状態となり NADH 要求性のリンゴ酸生成が促進され、NAD^+要求性の酢酸生成が抑制されたことが示唆された。

sake yeast, organic acid, RNA-seq

講演番号：2A09a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A09 会場

The uniqueness of antimicrobial spectrum of ophiobolin K produced by *Aspergillus ustus*

○Natthapat SOHSOMBOON, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

[Purpose] In previous studies of our group, co-cultivation of two cyclic dipeptides (CDP) producing strains, *Aspergillus ustus* and *Streptomyces albulus* was shown to induce the production of novel compound, dehydrophenylahistin (ΔPLH) with potent antitumor activity. These data indicate that co-cultivation system results in unique phenomena not observed by single strain cultivation. According to these knowledge, we further studied the effects of co-cultivation of two CDP producing fungal strains *A. ustus* and *A. repens*. Interestingly, we found that *A. ustus* could outcompete *A. repens* in co-cultivation. These result led us to know that *A. ustus* produce antifungal compound that inhibit the growth of *A. repens.* The aim of this study was to identify the antifungal compound produced by *A.ustus* and evaluate its antimicrobial activity.

[Results and Discussion] The antifungal compound from *A.ustus* was isolated with the guidance of spore germination assay using *A.repens* as the test fungi. Based on the antifungal activity against *A.repens*, the active compound was isolated and purified from culture plates of *A. ustus* (54 plates) by ethyl acetate extraction, reversed phase column chromatography followed preparative HPLC to obtain pure compound 2.07 mg. The structure of compound was elucidated by a combination of spectroscopic analyses (1D, 2D NMR, HRMS, UV and optical rotation) to be a sesterterpene, ophiobolin K. Furthermore, ophiobolin K was investigated for antifungal activity by spore germination assay. Ophiobolin K exhibited high specific activity against *A.repens* and *A.glaucus* with MIC value 0.78 μg/mL that higher than the activity of the positive control cycloheximide (MIC, 1 and 16 μg/mL, respectively), whereas ophiobolin K possessed weak activity against *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. niger* and *Penicillium aurantiogriseum* with the MIC range of 25-50 μg/mL. Interestingly, ophiobolin K also showed strong activity against Gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* with MIC range of 0.78-3.12 μg/mL but lower activity was observed against Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum* and *V. parahaemolyticus* with MIC range of 12.5-25.0 μg/mL. Ophiobolin K was found to have higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria than the positive control chloramphenicol that inhibited Gram-positive bacteria with MIC values range of 4-8 μg/mL. These results demonstrate that ophiobolin K is a unique compound with a wide antimicrobial spectrum against both fungi and bacteria, especially *A.repens*, *A.glaucus* and Gram-positive bacteria.

Sesterterpene, Co-cultivation, Antifungal activity

講演番号：2A09a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A09 会場

Aspergillus oryzae が生産する耐塩性乳酸菌生育阻害物質 heptelidic acid の解析

Analysis of salt-tolerant lactic acid bacteria growth inhibitor, heptelidic acid produced by *Aspergillus oryzae*

○篠原 靖智[1,2]、西村 郁子[1,2]、小山 泰二[1] ([1]野田産研、[2]現・キッコーマン)
○Yasutomo SHINOHARA[1,2], Ikuko NISHIMURA[1,2], Yasuji KOYAMA[1] ([1]NISR, [2]Kikkoman)

醤油は、麹菌(*Aspergillus oryzae* または *Aspergillus sojae*)による製麹および耐塩性酵母、耐塩性乳酸菌(*Tetragenococcus halophilus*)による発酵および熟成の 3 段階の工程によって作られるが、上流の製麹工程の際に *A. oryzae* を用いた場合、その後の発酵工程において、一部の *T. halophilus* が生育できないことが古くから経験的に知られていた。本現象は、*A. oryzae* が特異的に産生する抗菌物質によるものであると考えられていたが、その物質の同定はなされていなかった。
本研究では、この *A. oryzae* が生産する抗菌物質の同定ならびに生合成遺伝子の同定を目的に検討を行った。まず、ゲノム解読株である *A. oryzae* RIB40 および *A. sojae* NBRC 4239 を用いて調製した醤油諸味での *T. halophilus* の生育性を検討し、*T. halophilus* D10 は上述のとおり、*A. oryzae* RIB40 由来の醤油諸味では生育できないこと、*A. sojae* では生育可能なことを確認した。そこで、*T. halophilus* D10 の生育阻害活性を指標とした、*A. oryzae* RIB40 の代謝物スクリーニングを行い、本現象の原因物質の同定を試みた。その結果、*A. oryzae* RIB40 が glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 阻害剤である heptelidic acid (HA)と呼ばれるセスキテルペンラクトンの生合成能を有すること、本化合物が食塩存在下で耐塩性乳酸菌の生育阻害活性を示すことを見出した。
次に、*A. oryzae* RIB40 における HA 生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。HA 産生能を有することが知られている *Trichoderma virens* と *A. oryzae* が類似のテルペン生合成遺伝子クラスターを保持していることが知られていたことから、本クラスターが HA の生合成に関与している可能性を考えた。そこで、クラスター内に存在するテルペン環化酵素をコードすると予測される遺伝子(*hepA*)およびクラスターに隣接して存在する転写制御因子をコードすると予測される 2 遺伝子(*hepR*、*hepS*)の破壊株を作製し、LC-MS を用いて代謝物解析を行った。その結果、*hepA*、*hepR*、*hepS* いずれの遺伝子破壊株でも HA に相当するピークが消失していることが確認され、本クラスターが HA の生合成に関与している可能性が強く示唆された。興味深いことに、HA クラスター内には GAPDH をコードすると予測される遺伝子(*gpdB*)が存在する。解糖系で機能すると考えられている GAPDH をコードする *gpdA* と HA クラスターに存在する *gpdB* 両遺伝子の産物である GAPDH の組換えタンパク質を調製し、両酵素の HA 抵抗性を検討した結果、GpdA および GpdB に対する IC_{50} は、それぞれ 9.2 ± 0.1 μM および 538.7 ± 62.5 μM であり、GpdB は GpdA に比べ、約 60 倍の HA 抵抗性を有することが明らかとなった。このことから *gpdB* は自己耐性遺伝子として機能している可能性が示唆された。

Aspergillus oryzae, heptelidic acid, Terpenoid

講演番号：2A09a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A09 会場

子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による多価カルボン酸含有バイオサーファクタントの効率的生産

Effective production of biosurfactant with multivalent carboxyl groups by Ascomysota *Talaromyces trachyspermus*

○林 真人[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2] ([1]富山大工、[2]富山大院理工)
○Makoto HAYASHI[1], Maki TAKANO[2], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Dept. Eng. Univ. Toyama, [2]Grad. Sci. Eng. Univ. Toyama)

【目的】近年バイオサーファクタントは、高い生分解性や低い CMC、環境負荷低減の観点から注目されている。さらに、通常のサーファクタントにはない生理活性作用などの性質を有しており、新規バイオマテリアルとしての利用が期待されている。例えば、*B.subtilis* が生産する Surfactin は、皮膚への低刺激性や抗菌性、高い界面活性作用を有し、化粧品等に使用されている。さらに、1931 年に Clutterbuck らによって発見された *Penicillium spiculisporum* が生産する Spiculisporic acid(SA)は 1 個のラクトン環と 2 個のカルボキシル基を有する特異な構造である。それらのカルボキシル基を介して薬剤などの有用物質を修飾できる可能性を有している。我々は *P.spiculisporum* のテレオモルフである子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* が SA を生産することを見出した。そこで本研究では、本子嚢菌による SA 生産の生合成経路を解明するとともに、培養条件を改善することで効率的生産をさせることを検討した。

【方法・結果】本研究では、*P.spiculisporum* のテレオモルフである *Talaromyces trachyspermus* 10 株(NBRC6440、8890、9861、30066、31360、31757、31907、32238、106931、106932)を使用した。対象菌株として、SA の工業的生産に用いられる *P.spiculisporum* を用いた。培地成分は 0.8 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.5 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.05 g/L $FeSO_4$、1 g/L CSL、また炭素源として主に 100 g/L Glucose を使用し、初期 pH2.0 に調整した。培養は 500 mL 三角フラスコに培養液 100 mL を入れ、28°C、7 日間振盪した。培養液中の Glucose 濃度は HPLC により分析した。生成された Spiculisporic acid は、培養液中の固形分を Ethanol で溶解させ、再析出させることにより回収し、この精製物より生産量を求めた。*T.trachyspermus* などを振盪培養した結果、*P.spiculisporum* は SA を 4.2 g/L 生産した。さらに *T.trachyspermus* の全ての菌株においても SA の生産が確認できた。培養液から得られた精製物を 1D NMR($^{13}C \cdot {}^{1}H$)を用いて同定した結果、生産物が SA であることが実証できた。特に NBRC32238 が *P.spiculisporum* の生産量の 2.7 倍（11.3 g/L）生産できることが判明した。SA は Lauroyl-CoA と H_2O、2-oxoglutarate を基質として、decylhomocitrate synthase により合成されると推察されている。この反応系を実証するとともに、生合成経路を活用し、培養条件を検討することで、生産性を向上させることを検討中である。

Talaromyces trachyspermus, spiculisporic acid, biosurfactant

講演番号：2A09a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A09 会場

アフラトキシン産生菌に対する光照射の影響

Light irradiation influences aflatoxin synthesis

○鈴木 忠宏（農研機構食品研究部門）
○Tadahiro SUZUKI (NARO (NFRI))

背景・目的：糸状菌の産生する二次代謝産物の中で人畜に有害な物質はマイコトキシンと呼ばれる。マイコトキシン汚染が懸念されるのは作物や飼料などであり、食生活と密接な関係を持っているためその排除が重要である。また、近年の気候変動や物流網の拡大により、これまでリスクが低いと考えられていた種類のマイコトキシン汚染も新たに生じる恐れがある。これまでマイコトキシンの汚染リスク低減に関して検出技術の向上に焦点が当てられ、マイコトキシンの産生量を制御する技術は発展途上であった。そこで、本発表ではマイコトキシン産生の制御に関わる環境因子として光照射条件を選択し、糸状菌の代謝制御技術に繋がる知見の獲得を目指した。

材料・方法：マイコトキシンの中でもアフラトキシンは極めて発癌性の強い物質であり、穀類や香辛料など多岐にわたる汚染が確認されるために厳密な制御が求められる。そこで、本研究ではアフラトキシン産生菌として複数の *Aspergillus* 属菌を用いた。また、光照射条件として LED による単波長光照射環境を設け、光量子速密度を基準として光強度を設定した。単波長光源に加えて、青色と黄色にピークを持つ白色光 LED による照射環境も構築した。

結果・考察：プレート培養環境下においてアフラトキシンを産生する複数の *Aspergillus* 属菌に対し暗所あるいは低強度の青色、赤色、白色の光を照射したところ、青色光と白色光の照射により活発な分生子形成が確認され、暗所と赤色光条件ではこうした傾向が確認されなかった。また、アフラトキシンに由来する蛍光を対象とした比較観察では、低強度の青色光照射条件においてアフラトキシン産生量が増加した。一方で、赤色光照射によっても暗所条件よりアフラトキシン産生量の増加する菌株が確認された。こうした傾向は培養方法や照射強度の違いに寄らず概ね一致していた。既知の報告では、青色光の受容を介する制御機構に分生子形成やアフラトキシン産生が強く影響を受け、アフラトキシンの産生と分生子形成が共通性の高い制御を受けているものと示唆されているが、本研究の結果からは青色光による制御機構以外にも光受容とアフラトキシン産生に関する何らかの関係性の存在が示唆された。

謝辞：本研究の一部は JSPS 科研費 16K21606 の助成を受けたものです。

aflatoxin, light response, Aspergillus

講演番号：2A09a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A09 会場

Aspergillus terreus のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響
Effect of metal ion on itaconic acid production in *Aspergillus terreus*
○南 智之[1]、金政 真[2] ([1]中部大院・応生、[2]中部大・環境生科)
○Tomoyuki MINAMI[1], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ.)

【背景・目的】イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸である。その構造から重合や共重合によって線状高分子を形成できる特性があり、合成樹脂や合成繊維、接着剤や印刷インキ等、工業製品の原料や添加剤として幅広く利用されている。また、その安全性から食品添加物としても使用されている。イタコン酸は、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus itaconicus* などの糸状菌や、*Candida tsukubaensis* のような酵母による生産が知られているが、その工業生産には生産速度の観点から主に *A. terreus* が使用されている。我々は、本菌においてイタコン酸はクエン酸回路において生成するシス・アコニット酸を基質としてシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ (CAD) により生成されることを、CAD の遺伝子解析を通じて明らかにした。現在までにイタコン酸の工業生産に関する研究は数多く行われ、培養条件の最適化によるイタコン酸の生産性向上が試みられてきた。*A. terreus* におけるイタコン酸生産性は培地の pH、金属イオンや塩類の濃度に影響されることが知られている。また、*A. niger* では鉄イオン濃度を制限した培地において、クエン酸を多量に生産することが知られている。これは、鉄イオンが欠乏状態では、鉄イオンをクエン酸がキレートして効率よく生体内に取り込むためであると考えられている。しかし、*A. terreus* においては、未だにイタコン酸の生物学的機能には不明な点が多く、その生合成制御が明らかになればイタコン酸の機能の一端を解明できると期待される。そこで本研究では、イタコン酸がキレート剤として機能していると仮定し、金属イオンのイタコン酸生産性への影響を調べた。

【方法・結果】前培養した *A. terreus* を、最少培地を基本とし、異なった硫酸鉄(Ⅱ)七水和物濃度の培養条件にシフトし、培養を行った。培養後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて培養液のイタコン酸濃度を定量した。その結果、培地の硫酸鉄(Ⅱ)七水和物濃度が 2.5μg/L の条件では、5.0 μg/L の条件と比べ、イタコン酸生産量は約 1.4 倍に増加した。また、硫酸鉄(Ⅱ)七水和物濃度が 2.5μg/L の条件と培地に硫酸鉄(Ⅱ)七水和物を含まない条件とでは、生産量に大きな差は見られなかった。現在、代謝中間体を含めて詳細な分析を行っているので併せて報告する。

itaconic acid, *Aspergillus terreus*, metal ion

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2A09a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A09 会場

黄麹菌 Aspergillus oryzae における初期エンドソーム動態のコウジ酸分泌への関与
Involvement of early endosome motility in kojic acid secretion in Aspergillus oryzae

○都甲 祐介、竹川 薫、樋口 裕次郎（九州大農）
○Yusuke TOGO, Kaoru TAKEGAWA, Yujiro HIGUCHI (Kyushu Univ.)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の発酵・醸造産業で古くから利用され、高いタンパク質分泌能力を有する。近年、細胞内輸送におけるエンドサイトーシス経路で機能する初期エンドソームが、タンパク質分泌経路とも関連することが示唆されてきた。初期エンドソームの特徴的な動態は、ダイニンやキネシンなどの微小管系モータータンパク質に依存している。我々は、初期エンドソームとモータータンパク質のリンカーとして推定される AoHok1 を同定し、その破壊株を用いて黄麹菌における初期エンドソーム動態の生理的役割について解析してきた。*Aohok1* 破壊株ではコントロール株と比較して、分生子形成の抑制及び菌核形成の増加が確認され、初期エンドソーム動態が細胞の分化へ関与することが示唆された。また、オルガネラの細胞内分布解析を行ったところ、タンパク質分泌経路のオルガネラである小胞体・ゴルジ体の分布には異常が見られなかったものの、分泌小胞の集合体であるスピッツェンケルパーの形成異常が見られた。そこで実際に分泌タンパク質解析を行ったところ、コントロール株に比べて *Aohok1* 破壊株においてはα―アミラーゼの遺伝子発現およびタンパク質分泌の両レベルにおいて低下が見られた。このことから、初期エンドソーム動態がα―アミラーゼ生産にも寄与していることが示唆された[1)]。近年、タンパク質に限らず、二次代謝産物も細胞内膜輸送によって分泌されていることが報告されてきている。そこで本研究では、初期エンドソーム動態がコウジ酸分泌生産へ関与しているかを解析した。

まず、コントロール株と *Aohok1* 破壊株においてコウジ酸分泌のプレートアッセイを行ったところ、通常条件（30℃・pH 6.0）ではコントロール株と比較して、破壊株において分泌生産の遅延及び分泌量の減少が見られた。更に培養条件において温度と pH を変化させたところ、高温下（37℃）・pH 5.0 の条件で破壊株がコントロール株に比べて多くコウジ酸を分泌することがわかった。次に液体培養で通常条件と高温下・pH 変動条件で解析すると、破壊株ではコントロール株と比較して、通常条件ではコウジ酸分泌量の低下、高温下ではコウジ酸分泌量の増加が確認された。そこで、通常条件での分泌生産の立ち上がり時におけるコウジ酸生合成関連遺伝子の発現量を解析したところ、破壊株においてトランスポーターをコードする *kojT* の発現量が低下していた。以上から、初期エンドソーム動態がコウジ酸分泌生産において、少なくとも遺伝子発現レベルで関与していることが示唆された。現在、様々な培養条件下でのコウジ酸生合成関連遺伝子の発現解析およびコウジ酸生合成関連タンパク質の局在解析を行っている。

1) Togo *et al.* (2017) *Sci Rep* 7, 15757.

Aspergillus oryzae, early endosome, kojic acid

発表責任者：樋口裕次郎（y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A09a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A09 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるシクロピアゾン酸生合成遺伝子クラスターの新規遺伝子及び *cpaT* の解析

Functional analysis of a novel gene and *cpaT* in cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae*.

○楠 拓也[1]、石井 幸乃[2]、菊池 友希[1]、篠原 靖智[3]、小山 泰二[3]、徳岡 昌文[2]、進藤 斉[2]、穂坂 賢[2]（[1]東農大・院、[2]東農大・応生、[3]野田産研）
○Takuya KUSUNOKI[1], Yukino ISHII[2], Tomoki KIKUCHI[1], Yasutomo SHINOHARA[3], Yasuji KOYAMA[3], Masafumi TOKUOKA[2], Hitoshi SHINDO[2], Masaru HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Noda Inst. Sci. Res.)

【背景・目的】

シクロピアゾン酸（CPA）は *Aspergillus oryzae* の一部菌株やその近縁種が生産する二次代謝物であり、小胞体 Ca^{2+}-ATPase 阻害活性を有する。CPA 生合成遺伝子クラスター（CPA cluster）の解析から、*A. oryzae* は CPA 生合成に関わる *cpaA, cpaD, cpaO* に加えて、*cpaH, cpaM, cpaT, cpaR* を保持し、*cpaH* については 2-oxoCPA の生合成に関わることが明らかとなっている。また我々は speradine A 生産株である *A. tamarii* NBRC4099 との CPA cluster 配列の比較から、*A. oryzae* の CPA cluster が本来は speradine A 生合成遺伝子クラスターであり、*cpaM* における 4 塩基の欠失が原因となり、麹菌における最終生合成産物が 2-oxoCPA となったと推定している。本研究では CPA cluster の新規遺伝子及び *cpaT* について、機能が発現しない原因について明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

麹菌データベースより、*cpaT* の 934bp 下流にアミノ酸 203 残基のタンパク質をコードする新規遺伝子を見出した。本遺伝子は、CPA 生産が報告されている *A. flavus* や *Penicillium* 属にホモログが見出されたことに加え、転写が確認されること、CPA cluster の他の遺伝子と同様に *laeA* 破壊により発現が低下することから、CPA cluster の遺伝子であると考えられた。しかし、アミノ酸配列からは機能が推定できず、作製した遺伝子破壊株の CPA 及び 2-oxoCPA の生産量は対照株と差がなかった。

一方、トランスポーター（Major facilitator superfamily）と推定される *cpaT* も、遺伝子を破壊しても CPA 及び 2-oxoCPA の生産量に影響がないことが知られている。*A. tamarii* NBRC4099 と *A. oryzae* の *cpaT* 配列を比較したところ、明らかな変異や欠失は存在しないことから、*A. oryzae* の *cpaT* は機能を保持していると考えられた。そこで、これら遺伝子は本来の最終生合成産物である speradine A の生合成に関わると推定し、speradine A 生産麹菌株における遺伝子破壊株の取得を試みた。初めに *pyrG* マーカーを用いた相同組換えにより、4 塩基復帰した *cpaM* を麹菌に導入し、speradineA 生産麹菌株を取得した。さらに loop-out 法により *pyrG* マーカーを脱落した株を取得することで遺伝子破壊宿主を作製した。現在、この株を宿主として新規遺伝子及び *cpaT* の遺伝子破壊株を作製し、speradine A 生産における両遺伝子の機能解析を行っている。

cyclopiazonic acid, *Aspergillus oryzae*, secondary metabolism

講演番号：2A09a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A09 会場

麹菌によるクルクミン生産系の構築－SNF1 ホモログ遺伝子の破壊による malonyl-CoA 増産効果－

Production of curcumin in *Aspergillus oryzae*: effect of increasing malonyl-CoA production by the disruption of an SNF1 homolog gene

○菅 英一郎[1,2]、勝山 陽平[1]、丸山 潤一[1]、小山 泰二[2]、大西 康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]野田産研）
○ Eiichiro KAN[1,2], Yohei KATSUYAMA[1], Jun-ichi MARUYAMA[1], Yasuji KOYAMA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Noda Inst. Sci. Res.)

【背景・目的】糸状菌は一般に高い二次代謝産物生産性を有しており、糸状菌由来の新規二次代謝産物が近年大きな注目を集めている。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* では、多くの二次代謝産物生合成遺伝子が保有されているにもかかわらず、その多くは発現していないことがわかっている。このため、異種二次代謝産物生合成遺伝子によって合成される化合物の解析及び単離が容易であることから、麹菌は異種二次代謝産物の生産宿主としての利用が期待されている。しかし、異種遺伝子の効率的な発現や細胞内における基質化合物の供給など、麹菌を宿主として利用するにはいくつかの障壁がある。また、異種糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子を麹菌で発現させ、新たに生産される化合物を同定した例は多いが、植物由来二次代謝産物を生産した報告はごくわずかである。そこで、我々は麹菌に植物由来のポリケタイド合成酵素遺伝子を導入し、植物由来二次代謝産物を生産する系を構築するとともに、伸長基質として利用される malonyl-CoA の供給量を増やすことでその生産性の向上を試みた。
【結果・考察】*A. oryzae*Δ*Ku70* 株を宿主とし、内在性の amylase B 遺伝子座にクルクミノイド合成酵素（CUS）をコードする遺伝子を導入した。マルトースを炭素源とした寒天培地に CUS の開始基質アナログである feruloyl-NAC を添加し、3 日間培養したところクルクミンの生産が確認された。次に、malonyl-CoA の増産を目的に、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において malonyl-CoA 蓄積に関与すると報告されている 4 つの酵素遺伝子のホモログに着目し、malonyl-CoA 生産に正に働くと推測される acetyl-CoA carboxylase（ACC; AO090011000838）遺伝子を過剰発現した株および負に働くと推測される acetyl-CoA hydrolase（ACH; AO090005000588）、palmitoyl-CoA ligase（FaaA; AO090011000642）、sucrose non-fermenting 1（SNF1; AO090701000767）の各遺伝子をそれぞれ破壊した株を作製した。作製した株のクルクミン生産量を比較したところ、Δ*AOsnf1* 株においてクルクミンの生産量が 2 倍に増加していた。酵母において SNF1 は ACC をリン酸化しその酵素活性を阻害することが知られている。麹菌においても AOsnf1 が同様に機能し、その遺伝子を破壊することで、malonyl-CoA が増加するため、クルクミン生産量が向上したと考えられる。さらに、ACC の活性に必要なビオチン（1 μM）を培地に添加したところ、Δ*AOsnf1* 株のクルクミン生産量は 2.3 倍に増加した。現在、細胞内の malonyl-CoA 濃度と二次代謝産物生産量の相関を調べるため、解析を進めている。

Aspergillus oryzae, curcumin, malonyl-CoA

講演番号：2A09a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A09 会場

糸状菌 Plectospira myriandra による C14 脂肪酸高含有油脂の生産

C14 fatty acid high content lipid production by filamentous fungus Plectospira myriandra

○横山 晋太郎[1]、安藤 晃規[1,2]、小川 順[1,2] ([1]京大院農、[2]京大生理化学)
○Shintaro YOKOYAMA[1], Akinori ANDO[1,2], Jun OGAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Physiological Science, Kyoto Univ.)

当研究室では、これまでに有用な脂肪酸を生産する微生物の探索や育種を行い、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸をはじめとする炭素数 18 以上の様々な高度不飽和脂肪酸（PUFAs）を高含有する油脂の微生物生産を報告してきた。一方、一般的に生物は炭素数 16 以上の脂肪酸を生合成するため、炭素数 16 以下の脂肪酸に関しては天然にはあまり存在が知られていない。一部の植物や牛肉に含まれる Myristoleic acid（*c*9-tetradecenoic acid; 14:1$^{\Delta 9}$）が前立腺癌の LNCaP 細胞のアポトーシスとネクローシスを引き起こすことや、Physeteric acid（*c*5-tetradecenoic acid; 14:1$^{\Delta 5}$）が脂肪酸酸化異常症の患者において検出されることが報告されている。しかし、生理機能解析は、これらの炭素数 14（C14）脂肪酸の適当な供給源が存在しないため遅れている。本研究では、C14 脂肪酸を生産する微生物のスクリーニングを行い、糸状菌 *Plectospira myriandra* を見いだしたので報告する。

【結果・方法】

研究室保存株約 300 種のカビの脂肪酸組成を分析した結果、C14 の脂肪酸を著量蓄積する *P. myriandra* を見いだした。生産した脂質は、GC/MS 解析から、主に 3 種の炭素数 14 の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を高濃度含有していることを明らかにした。また、炭素数 14 の脂肪酸のうち、14:0 以外の構造未知の 2 種のピークの脂肪酸に関して現在、HPLC により生成し、NMR 分析を行っている。また *P. myriandra* による脂肪酸に関して、炭素源、窒素源、炭素源濃度、窒素源濃度、培養温度、振盪速度、初期 pH について至適条件の検討を行った。培養至適条件下、培養 12 日目の脂肪酸生産性は 5.3 g/L となり、C14 の脂肪酸の占める割合は 80%に達した。また、本菌の形質転換に必要になる遊走胞子形成における培養条件の検討を行い、遊走胞子の生産の至適条件を明らかにした。

Lipid production, Fatty acid, Filamentous fungus

講演番号：2A09a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A09 会場

Physicochemical screening による糸状菌由来新規アルカロイドの探索 -生産培地の検討と二次代謝産物の解析-

Search for new fungal alkaloids by physichochemical screening -Study on the modification of producing media and analysis of secondary metabolites-

○宮野 怜[1]、松尾 洋孝[1,2]、野中 健一[1,2]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、中島 琢自[1,2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研)
○ Rei MIYANO[1], Hirotaka MATSUO[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Kazurou SIOMI[1,2], Yōko TAKAHASHI[2], Satoshi ŌMURA[2], Takuji NAKASHIMA[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Science, KItasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Science, Kitasato Univ.)

【背景・目的】糸状菌および放線菌は抗生物質を含む多様な二次代謝産物を生産することが知られており、重要な天然物探索源となっている。微生物代謝産物には強力な生物活性を示す化合物が多く、特にアルカロイド関連物質 (以下アルカロイド) は、その生物活性の多様性から医薬品として用いられている例が多い。糸状菌由来の二次代謝産物で例を挙げると、世界初の抗生物質である penicillin[1] をはじめ、麦角菌由来で血管収縮作用を示す ergotamine[2] などが知られている。

北里生命科学研究所 (大村創薬グループ) は微生物の二次代謝産物から約 500 種類の新規化合物を発見してきた。同グループは化合物の物理化学的性状 (物性) を利用した呈色反応で多くのアルカロイドを発見してきた。大村らが発見した herquline は、*Penicillium herquei* Fg-372 が生産するアルカロイドで、その分子内に 5 員環 (6-9-6-5-6) および捻れジペプチドといった構造的特徴を有する[3]。

本研究の目的は、ドラーゲンドルフ試薬やニンヒドリン試薬による呈色反応や LC/UV/MS で得られる化合物の物性情報による physicochemical (PC) screening[4] を行い、糸状菌から新規アルカロイドを探索することである。

【方法】初めに、アルカロイドの生産性に影響を及ぼす培地成分を見出す目的で gliotoxin 生産菌である *Trichoderma* sp. FKI-7573 株を用いて検討した。基本培地は米を主成分とする固形培地を用いた。窒素源として 6 種類の天然物 (ペプトン等) および 6 種類の含窒素塩類 ($(NH_4)_2SO_4$ 等) を添加剤として使用した。さらに、タンパク質を多く含むきな粉の影響について併せて検討した。FKI-7573 株を、上記の生産培地に植菌後、室温で 14 日間静置培養し、メタノールを加えて培養物抽出液を作製した。その培養物抽出液を LC/UV-MS で測定し、代謝産物の生産性について比較をした。

【結果】培養物抽出液の LC/UV-MS 解析の結果、26 種類の生産培地の中で米 10 g に対して 20 mg の $(NH_4)_2SO_4$ を加えた生産培地で顕著な gliotoxin の生産性向上が観察された。また、この培地にきな粉を添加した培地を用いることで多くの二次代謝産物が観察された。これらのピークの中で 2 化合物 (FKI-7573A および B) が天然物データベースとの照合により新規化合物と推定された。FKI-7573A および B の分子量は 509 および 508 であり、FKI-7573A はアルカロイドであることが示唆された。

1) *Br. J. Exp. Pathol*., **10**, 226–236 (1929), 2) *Eur. J. Clin. Pharmacol*., **30**, 331–334 (1983), 3) *J. Antibiot*., **32**, 786-790 (1979), 4) *Biochem. Pharmacol*. **15**, 42-55 (2017).

Filamentous fungi, Alkaloid, PC screening

講演番号：2A09a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A09 会場

真核微生物が生産する適合溶質に関する研究

Study on compatible solute produced by eukaryotic microorganism

○山下 暁史[1]、山本 真悠子[2]、土屋 美菜子[2]、佐々木 雅史[3]、堤内 要[3]、金政 真[2] ([1]中部大院・応生、[2]中部大・環境生科、[3]中部大・応生)
○Akifumi YAMASHITA[1], Mayuko YAMAMOTO[2], Minako TSUCHIYA[2], Masafumi SASAKI[3], Kaname TSUTSUMIUCHI[3], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol. Chubu Univ., [3]Dept. Biol. Chem. Chubu Univ.)

【目的】生物は様々な環境ストレスから細胞を保護するために、ストレスの種類に応じた防御機構を有している。浸透圧ストレスは塩や糖などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動するのと同時にナトリウムイオンなどホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。これを防ぐため、生物は様々な適合溶質(compatible solute)を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。原核生物では、好塩細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 等においてエクトイン（1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid）が適合溶質として知られている。エクトインは環状アミノ酸構造の双性イオンであり、細胞外の塩濃度依存的に細胞内エクトイン濃度が調整されることで浸透圧耐性に貢献している。また、タンパク質、核酸、細胞膜等の生体高分子を安定化することにより、ストレスから細胞を保護すると考えられている。エクトインは複数の細菌に存在することが報告されているが、糸状菌を含め真核微生物にエクトインは存在しないと考えられてきた。また、エクトインはその特性を活かして、タンパク質安定剤、PCR エンハンサー、化粧品添加物などにも応用されている。エクトインの工業生産には好塩細菌 *Halomonas elongata* が用いられているが、高塩濃度での培養による生産設備の劣化や、生育速度の小ささなどが課題となっている。一方、糸状菌や酵母は物質生産速度が大きいことからセルファクトリーとして有望であるが、これまでエクトインの生産が報告されていない。そこで、我々は真核微生物の代謝物解析に取り組み、エクトインの存在を確認したことを発表する。
【方法と結果】液体培養したイタコン酸生産糸状菌 *Aspergillus terreus* の菌体を回収し、電気泳動ー質量分析法（CE-MS）により網羅的代謝物解析を行ったところ、真核微生物として初めてエクトインを発見した。より高精度に定量分析するために、重水素化したエクトインを新たに合成して LC-MS/MS 分析を試みた。液体培養した *A. terreus* の菌体の破砕物に重水素化エクトインを添加して分析したところ、菌体 1g あたり 9.66ng/g のエクトインが検出された。このことから、*A. terreus* は菌体内にエクトインを有していることが明確となった。日本酒や味噌などの和食に不可欠な麹の生産に用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* 等についても並行して分析したので、併せて報告する。

compatible solute, *Aspergillus terreus*, ectoine

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2A09a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A09 会場

FBA を用いた出芽酵母のメバロン酸経路強化遺伝子破壊の探索と評価
Identification of gene deletions for improving a mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by using FBA.

○神田 義貴、戸谷 吉博、松田 史生、清水 浩（阪大院・情報）
○Yoshiki KANDA, Yoshihiro TOYA, Fumio MATSUDA, Hiroshi SHIMIZU (Grad. Sch. IST)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のメバロン酸経路の強化は、カロテノイド、テルペノイド、ステロールなどの様々な有用イソプレノイド化合物の高生産につながると期待される。そこで、本研究では、代謝シミュレーションによってメバロン酸経路の強化に有効な遺伝子破壊を推定し、遺伝子破壊株を培養、分析して、その有用性を評価した。
【方法】フラックスバランス解析（FBA）に基づく代謝シミュレーションは、酵母ゲノムスケールモデル iMM904 と CobraToolbox を用いて実行した。*S. cerevisiae*BY4742 株と、The Yeast Knockout (YKO) Collection の 1 遺伝子破壊株を用いた。形質転換には酢酸リチウム法を用いた。20 g/L のグルコースを炭素源とする SC 培地で培養し、菌体中のスクアレンはドデカンを用いて抽出し、ガスクロマトグラフ-質量分析器 (GCMS) で定量した。
【結果】メバロン酸経路の活性指標となる代謝物を決定するため、酵母由来の変異型 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素遺伝子 (*tHMG1*) を過剰発現したメバロン酸経路強化株を構築、培養した。抽出した代謝物組成を GCMS 分析でコントロール株と比較したところ、メバロン酸経路下流の代謝物であるスクアレン含量が増加していたことから、スクアレンをメバロン酸経路の活性指標として用いることにした。さらに、フラックスバランス解析（FBA）に基づく代謝シミュレーションを実施し、増殖と連動したスクアレン生産量を予測した。その結果、53 遺伝子が欠損するとスクアレンの生産量が向上すると予測された。また先行研究から、欠損するとカロテノイド生産量が向上する 64 個の遺伝子を選抜した。そこで、予測された遺伝子の 1 遺伝子欠損酵母株に *tHMG1* を導入し、SC 培地で培養した時の菌体中スクアレン含量を測定したところ、32 株でスクアレンの生産性が実際に向上していた。また、スクアレン含量は最大で 2.3 倍向上していた。さらに、32 遺伝子中 16 遺伝子は FBA で予測されたものだった。

Saccharomyces cerevisiae, Mevalonate pathway, Flux balance analysis

講演番号：2A09a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A09 会場

”超”高親和性型ペプチド輸送体発現酵母における香り成分生産性増強効果の解析
A contribution of peptide transporter for flavor-compounds productivity on yeast
○中山 綾花[1]、Vu Thi Tuyet Lan[1]、河合 駿[2]、蟹江 慧[2]、加藤 竜司[2]、河原崎 泰昌[1]、伊藤 圭祐[1]
([1]静県大・食栄、[2]名大院・創薬科学)
○Ryoka NAKAYAMA[1], Lan VU THI TUYET[1], Shun KAWAI[2], Kei KANIE[2], Ryuji KATO[2], Yasuaki KAWARASAKI[1], Keisuke ITO[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Nagoya Univ.)

【背景と目的】

酵母はビール、清酒や味噌等の発酵食品の製造において香り成分の生成に大きく寄与する。香り成分にはアミノ酸を原料として生合成されるものが多く存在する一方、アミノ酸源の取り込みを担う輸送体と香り成分生産性の関連は十分明らかではない。本研究では、アミノ酸源の高効率な取り込みを担うプロトン共役型オリゴペプチド輸送体（POT）に着目し、*Saccharomyces cerevisiae*における香り成分生産性との関連を検討した。

【方法と結果】

アミノ酸源の吸収と香り成分生産性との関連を調べるため、*S. cerevisiae* の持つ POT の高機能化を試みた。分子系統樹上で離れた位置に存在する各種生物由来の POT を解析した結果、現在までに知られる中で最も基質親和性の高い“超”高親和性型の POT として *Candida albicans* 由来 PTR2（caPTR2）を見出した。ジペプチドライブラリーを用いた網羅的基質親和性解析の結果、caPTR2 の基質多選択性は我々が明らかとした *S. cerevisiae* 由来 scPtr2p と類似しており[1)]、芳香族・分岐鎖アミノ酸含有ジペプチドを高効率に輸送することが明らかとなった。POT 欠損 *S. cerevisiae*（BY4742-*ptr2Δ*）株を宿主として作製した caPTR2 発現株は scPtr2p 発現株よりも大豆ペプチド培地中での増殖能に優れており、“超”高親和性型 POT を介してアミノ酸源が高効率に取り込まれることが示された。続いて各種香り成分の生産性を解析した結果、特にバラ様の香りを持つβフェネチルアルコールの生産量は、scPtr2p 発現株よりも caPTR2 発現株で顕著に増加していた。caPTR2 を介して高効率に取り込まれる芳香族アミノ酸が原料となり、βフェネチルアルコールの生合成が促進されたと考えられる。一方、アミノ酸を生合成原料としない香り成分については生成量の増加は確認されなかった。以上の結果より、高機能な POT を持つ *S. cerevisiae* 株には、アミノ酸を生合成原料とする香り成分の高い生産性が期待できることが示唆された。

1）K. Ito *et al.*, ***Nature Commun.***, 2013, 4(2502).

peptide transporter, flavor compounds, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A09a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A09 会場

細胞性粘菌が生産するハロゲン化有機化合物の機能と生合成機構の解析
The function and biosynthesis mechanism of halogenated organic compounds produced by cellular slime mold
○飯島 知之[1]、品川 知則[1]、臼杵 豊展[2]、鈴木 教之[2]、KAY Robert R.[3]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院・理工、[2]上智大・理工、[3]MRC 分子生物学研究所)
○Tomoyuki IIJIMA[1], Tomonori SHINAGAWA[1], Toyonobu USUKI[2], Noriyuki SUZUKI[2], Robert R. KAY[3], Tamao SAITO[2] ([1]Sophia Univ. Grad. Sch. of Sci. & Tech., [2]Sophia Univ. Faculty of Sci. & Tech., [3]MRC, LMB)

【背景・目的】
土壌微生物の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は通常単細胞アメーバとして生活しているが、飢餓状態になると細胞が集合し休眠状態の胞子とそれを支える柄からなる子実体を形成する。ポリケタイド合成酵素（PKS）などの二次代謝酵素の発現が見られる柄細胞は化学物質を介した土壌生態系とのコミュニケーションを行っていると考えられる。本研究では柄細胞で合成される塩素化化合物に着目してその構造解析及び抗菌活性試験からその機能を推測し、その生合成機構を解析する中で明らかになってきた生合成酵素を再利用している仕組みの解明を目的とした。
【結果・考察】
柄細胞で生産される塩素化化合物の構造解析を行うために *D. discoideum* V12M2 株の柄細胞から有機化合物を抽出し分離精製を行った結果、3 つの塩素を含有する LCC-1 (Late Chlorinated Compound-1)の単離に成功した。HRFABMS、NMR、X 線結晶構造解析からその構造が 1-(4,6,8-trichloro-1,3,9-trihydroxy-7-methoxy-2-dibenzofuranyl)- hexan-1-one であることが分かった。また最小阻害濃度を *Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* b/r 株、*K. aerogenes* に対して測定した結果 *B. subtilis* の増殖を強く阻害する一方で、*E. coli* b/r は比較的高い濃度のみで増殖を阻害し、*K. aerogenes* に関しては増殖を阻害しないことが分かった。この化合物の生理学的な意義として、好みの細菌を胞子と共に連れていく「farmer」の性質を LCC-1 の抗菌活性が補助しているのではないかと考えている。
生合成機構の解析では、LCC-1 の骨格の一部が PKS の一つである SteelyB (StlB)の産物 1-(2,4,6-TriHydroxyPhenyl)Hexan-1-one (THPH)と共通していることと、*stlB* knock out 株は LCC-1 を合成できないことから THPH がその前駆体であると考えられた。さらに外部から *stlB* knock out 株に THPH を与えることで LCC-1 の合成が回復したことから、THPH が LCC-1 の前駆体であることが明らかとなった。THPH は子実体形成前の過程で合成される塩素化化合物 DIF-1 (Differentiation Inducing Factor-1)の前駆体でもあることから、LCC-1 と DIF-1 の両方の生合成に StlB とハロゲン化酵素 ChlA が利用されていることになる。2 つの酵素遺伝子の発現場所を GFP により確認した結果、DIF-1 の合成期と LCC-1 の合成期では発現場所が変わっていたことから、発現場所を変えることで産物の変換を制御していることが示唆された。

cellular slime mold, halogenated compound, polyketide

講演番号：2A09a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A09 会場

Functional analysis of histidine kinase DhkM in Dictyostelium development

○Alvin SANJAYA[1], Jiang TIANLONG[1], Tsuyoshi ARAKI[2], Shinkoh NANBU[2], Tamao SAITO[2]
([1]Sophia University, Graduate School of Science and Technology, [2]Sophia University, Faculty of Science and Technology)

Background and Research Objective

Dictyostelium discoideum is a soil-dwelling amoeba of cellular slime mold class, a good model system to study developmental biology and cell differentiation because it can form fruiting body from two distinct cell types: stalk and spore. Spore development holds a primary importance for *D. discoideum* survival against starvation. Meanwhile, the stalk facilitates proper spore dispersal. We have attempted to characterize the null mutant of *Dictyostelium* histidine kinase M (*dhkM*) since *dhkM*¯ mutant has a defective stalk maturation *in vitro* [Giusti *et al*. MBoC. (2010)], and thus, we hypothesized the protein to be a candidate for DIF-1 receptor. (DIF-1 itself stands for differentiation-inducing factor 1 and has an essential role in *D. discoideum* prestalk cell differentiation). By analyzing the phenotype of *dhkM* null mutant, we hoped to elucidate the function of DhkM in *D. discoideum* stalk cell differentiation mechanism.

Method and Results

Through phenotypic comparisons with *Steely B*¯ mutant, which is known to be unable to biosynthesize the chlorinated hexaphenone DIF-1 [Saito *et al*. Dev. Biol. (2008)], and accordingly, a “DIF-less” mutant, and DIF-1 signaling analyses, we concluded that DhkM was improbable to be the DIF-1 receptor. However, upon a closer examination of the mutant, we discovered that *dhkM*¯ mutant spores exhibited a significantly lowered resilience toward a detergent, Triton X-100. Nonetheless, calcofluor staining of the spore demonstrated that its cellulose coating was still intact, even though the shape was abnormal. We elaborated further on the possibility that prespore and prestalk genes expression profiles might be affected by RT-PCR. We concluded that DhkM does indeed have a role in the spore maturation pathway but unlikely to be involved in DIF-1 reception in *D. discoideum*.

Histidine Kinase, Spore Differentiation, Cellular Slime Molds

講演番号：2A09p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A09 会場

自然界からの微生物由来新奇抗生物質の探索

Search of novel antibiotics from microorganisms among natural isolates

○宮内 勇樹、小池 美弥、谷川 実、浮谷 基彦、西村 克史（日本大学理工学部）
○Yuki MIYAUCHI, Miya KOIKE, Minoru TANIGAWA, Motohiko YKIYA, Katusi NISIMURA (Nihon Univ. College of Science and Technology)

[目的]

近年, 薬剤耐性菌の増加が問題となっていることから, 新奇の作用機序を有する抗生物質の開発が急務となっている. 多種多様な微生物が生産する様々な構造の代謝産物の中には, 新奇な生理作用を示す物質が数多く存在すると考えられる. 従って, 微生物は新奇抗生物質探索における有用な資源である. 本研究では, 新奇な構造の抗生物質を得ることを目的として, 自然界からの微生物由来新奇抗生物質の探索を行い, その性質と構造を調べた.

[方法及び結果]

日本の 98 箇所から土壌サンプルを採取し 430 種類の微生物を分離した. Agar piece 法を用いて抗菌活性試験 (検定菌 : 大腸菌, 枯草菌, 酵母) を行った結果, 6 種類の抗生物質生産菌が得られた. 大腸菌と枯草菌に対して抗菌活性を示した KM4 株を選択し, 以下の実験に用いた.

KM4 をポテト-グルコース培地で液体培養 (107 rpm, 27℃, 3 day) し, 培養液を得た. 培養液に等量のエタノールを加え激しく振盪し, 遠心分離 (10,000 *g*, 15 min, 4℃) 後, 上澄みを回収した. 上澄みのエタノールを減圧下で除去し, 遠心分離 (10,000 *g*, 15 min, 4℃) 後, 上澄みを回収した. 上澄みを強酸性陽イオン交換カラムクロマトグラフィー, ODS カラムクロマトグラフィー, ゲル濾過カラムクロマトグラフィー, 逆相カラムクロマトグラフィー (HPLC) の順に通し, 精製 KM4 由来抗生物質を得た. 得られた KM4 由来抗生物質の化学構造を ^{1}H および ^{13}C NMR を用いて解析した結果, 糖と芳香環を示すシグナルが得られた. KM4 由来抗生物質は 260 nm に吸収極大を持つ黄色の粉末であり, ビュレット反応およびニンヒドリン反応に対し陰性であった. これらのデータから, KM4 由来抗生物質は, 核酸系の物質であると推定された.

KM4 の 16S rDNA の塩基配列を用いた解析の結果, KM4 は *Paenibacillus peoriae* と 98.8%の相同性を示した. *Paenibacillus* 属の細菌が作る核酸系抗生物質は現在まで報告されていないので, KM4 由来抗生物質は新奇の構造を持つ物質である可能性が高いと考えられる.

antibiotics, *Paenibacillus* sp.

講演番号：2A09p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A09 会場

固／液界面培養による生物活性物質生産カビ、放線菌のスクリーニング
Screening of bioactive substance-producing fungi and actinomycetes in solid-liquid interfacial cultivation
○小田 忍[1]、中川 愛美[1]、野村 聖也[1]、新家 一男[2]、加賀谷 紀貴[2]、河原 哲平[2]、大箸 信一[1]([1]金沢工大ゲノム研、[2]産総研創薬基盤)
○Shinobu ODA[1], Manami NAKGAWA[1], Seiya NOMURA[1], Kazuo SHINYA[2], Noritaka KAGAYA[2], Teppei KAWAHARA[2], Shinichi OHASHI[1] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]AIST)

【目的】　多剤耐性菌の拡大が全人類的な脅威となりつつある今日、新規で多様な抗菌剤群の開発が急務となっている。近年筆者らは、液／液(培地／有機溶媒)界面培養で増殖させたカビを対象とする界面スクリーニング法を提案し、液体培養とは大きく異なる疎水性代謝物が生産できることを報告した。しかし、この液／液界面スクリーニング法に増殖の遅いカビや放線菌を適用することには限界があった。そこで本研究では、増殖の遅いカビのマット切片や放線菌細胞を効果的に水／有機溶媒界面に位置させることが可能な、軟寒天／有機溶媒の固／液界面スクリーニング法を考案し、その代謝物プロファイルを詳細に調べた。さらにその有用性を確認するために、多数のカビ並びに放線菌を対象として、抗真菌物質並びに細胞毒性物質のスクリーニングへ応用した。
【方法】　*Aspergillus sojae*、*Penicillium multicolor* などカビ 4 株について、液体培養、液／液界面培養、固／液界面培養間での水層と有機層中の代謝物の比較を行った(HPLC-PDA を使用)。抗真菌活性については、寒天濃度 0.5%の軟寒天培地 5 ml を 20 ml 容バイアルに調整し、909 株のカビマット小片を 1 点、あるいは 106 株の放線菌懸濁液 50μl を寒天表面に植菌して 3 日間前培養した。低沸点ジメチルシリコンオイル(KF-96L-0.65CS、信越化学) を 1.5 ml 重層して 7 日間静置培養した後、有機層を回収して自然脱溶媒後に再溶解し、*Pichia anomala* NBRC 10213 を対象にペーパーディスク法で評価した。細胞毒性については、SKOV-3(ヒト卵巣腺ガン)、MESO-1(ヒト悪性胸膜中皮腫)、Jurkat(ヒト T リンパ球)細胞株を対象とし、発光生存率アッセイ(Promega Corp.)により評価した。
【結果】　カビ 4 株全てについて、液体培養で得られた代謝物と両界面培養の有機層中に蓄積された代謝物とは大きく異なるプロファイルを与え、従来のスクリーニングでは得られなかった新規な代謝物が両界面培養法で得られる可能性が強く示唆された。これらの株のうち、界面培養した *P. multicolor* IAM 7153 は、その有機層中に生物活性アザフィロン類である sclerotiorin を著量蓄積した。また、固／液界面培養法は増殖の遅いカビや放線菌にも適用可能であること、固／液、液／液両界面培養法で得られる疎水性代謝物のプロファイルが類似していることも確認できた。固／液界面培養法で得られた多数の代謝物を *P. anomala* を対象とする抗真菌アッセイに適用したところ、909 サンプル中 323 種に抗真菌活性が確認された(ヒット率 35.5%)。放線菌に関しては、106 株中 23 株が抗真菌活性物質を生産していた(ヒット率 21.7%)。一方、細胞毒性アッセイの結果より、SKOV-3 に対しては 8 株、MESO-1 株に対しては 23 株、Jurkat に対しては 30 株の代謝物がヒットした。

interface screening, interface bioreactor, antibiotics

発表責任者：小田忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2A09p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A09 会場

エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索
Search for new compounds using ergosterol resin
○伊豆田 祥子[1]、高坂 尚平[2]、河合 真[2]、宮野 怜[1]、松尾 洋孝[1,3]、松本 厚子[1,3]、三浦 宏美[1,3]、野中 健一[1,3]、高橋 洋子[3]、大村 智[3]、中島 琢自[1,3] ([1]北里大院・感染制御、[2]富士シリシア化学株式会社、[3]北里大・生命研)
○Shoko IZUTA[1], Shohei KOSAKA[2], Makoto KAWAI[2], Rei MIYANO[1], Hirotaka MATSUO[1,3], Atsuko MATSUMOTO[1,3], Hiromi MIURA[1,3], Kenichi NONAKA[1,3], Yoko TAKAHASHI[3], Satoshi OMURA[3], Takuji NAKASHIMA[1,3] ([1]Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ., [2]Fuji Silysia Chemical Ltd., [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【目的】 Amphotericin B (Amph-B) はポリエン系の抗真菌薬であり、1960 年代に開発され 50 年以上深在性真菌症薬のゴールドスタンダードとして使用されてきた。Amph-B は真菌の細胞膜を構成しているエルゴステロール (ES) と結合することで強力な抗真菌活性を示す。Amph-B の標的分子であるエルゴステロールをシリカゲルに結合させたエルゴステロール樹脂 (以下、Si-ES 樹脂) を用いて新規抗真菌物質を探索した。その結果、抗真菌活性物質として知られているポリエン系の Amph-B や Filipin の他に、抗真菌活性の報告がないフェナジン骨格やピリジン骨格を有する窒素を含む化合物も Si-ES 樹脂に吸着することが分かった。そこで、Si-ES 樹脂の特徴を把握すると共に放線菌培養液から新規物質の探索を行った。
【方法】 シリカゲルの表面の水酸基 (シラノール) にエルゴステロールを結合させた Si-ES 樹脂を作製した。放線菌培養液抽出物を Si-ES 樹脂に供し、水で洗浄後、メタノールで溶出させ、濃縮後少量のメタノールに再溶解させ、解析用サンプルを調整した。LC/UV-MS 解析により、Si-ES 樹脂に吸着した化合物の物理化学的性状を収集し、その情報をもとに天然物データベース (Dictionary of Natural Products) で検索した。新規物質と推定した化合物を単離・精製し、各種生物活性を評価した。
【結果・考察】 放線菌培養液抽出物 470 サンプルをスクリーニングした結果、*Amycolatopsis* sp. K16-0194 株が生産する Si-ES 樹脂吸着物質 (K16-0194 B) に着目した。また、UV スペクトルおよび質量分析の結果、類縁体と考えられる Si-ES 樹脂非吸着物質 (K16-0194 A) も併せて取得した。*Amycolatopsis* sp. K16-0194 株培養液 6 L を遠心分離し上清と菌体に分けた。K16-0194 B は上清を酢酸エチルで抽出後、分取用 Si-ES カラムに吸着させ、水で洗浄後、メタノール-水系で溶出し、16.6 mg 取得した。K16-0194 A は菌体を MeOH で抽出し、HP 20 および ODS を用いたフラッシュクロマトグラフィーにて精製を行い、86.7 mg 取得した。ESI-MS および種々 NMR による構造解析の結果、2 つの化合物はコア構造にジピリジン骨格を有することから、dipyrimicin A および B と命名した。Dipyrimicin A はカルボン酸を有し、dipyrimicin B はそのアミド体であった。Dipyrimicin A は強力な抗菌・抗真菌活性および細胞毒性を示した。一方、dipyrimicin B は著しい活性の低下が観察された。Dipyrimicin 類の生物活性発現にはカルボン酸が重要であると考えられる。
上記の結果から、ピリジン骨格を有する新規物質が得られたことから、Si-ES 樹脂は含窒素化合物と相互作用を示すことが示唆された。

actinomycetes, ergosterol resin, PC screening

発表責任者：伊豆田祥子（mi17002@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2A09p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌二次代謝産物の物理化学的性状を指標とした physicochemical screening による新規物質の探索

Search for new actinomycete secondary metabolites by physicochemical screening

○中島 琢自[1,2]、宮野 怜[2]、松尾 洋孝[1,2]、中西 淳[3]、高橋 洋子[1]、大村 智[1] ([1]北里大・生命研、[2]北里大院・感染制御、[3]物質・材料研)

○Takuji Nakashima[1,2], Rei Miyano[2], Hirotaka Matsuo[1,2], Jun Nakanishi[3], Yoko Takahashi[1], Satoshi Omura[1] ([1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [2]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [3]NIMS)

【目的】放線菌は、構造的にユニークで強力な生物活性を示す天然物を生産することから産業上重要な生物資源である。生物活性を指標にした探索研究で放線菌の二次代謝産物からこれまで多くの有用化合物が発見されてきた。一方、化合物の物理化学的性状（物性）を利用した探索で発見され、その後有用な生物活性が見出された天然物もある。一例として、北里生命化学研究所で発見されたインドロカルバゾール骨格を有するスタウロスポリンは、発見から 9 年後にプロテインキナーゼ阻害活性が見出され、研究用試薬として汎用されている。我々は、放線菌が生産する化合物の物性に注目し、physicochemical（PC）screening と称し LC/UV や LC//MS などの機器分析により、新規と推定した化合物を取得・構造決定後、得られた新規物質について様々な生物活性を検討した。

【方法】北里生命化学研究所が保有する生物活性物質生産放線菌 300 株を用いて、複数の培地で生産培養を行い、等量のエタノールを添加し、培養液抽出物を作製した。その培養液抽出物を LC/UV/HR-ESIMS で分析し、化合物の溶出時間、UV スペクトル、質量分析値などを収集した。これらの情報を主成分解析およびデータベース照合により新規と推定された化合物を単離・精製した。取得した化合物は各種機器分析により構造決定後、様々な生物活性を評価した。

【結果および考察】本手法を用いて、mangromicin や trehangelin など新規物質を発見してきた。[1)] 今回は、1) streptomycin 生産菌 *Streptomyces griseus* OS-3601 が生産する新規物質 iminimycin A[2)]、2) nanaomycin 生産菌 *S. rosa* subsp. *notoensis* OS-3966 から得られた新規類縁物質 nanaomycin H[3)] について報告する。1) Iminimycin A は分子内にイミニウムイオンを有し、放線菌代謝産物として初の報告である。2) Nanaomycin 類（A～E）は 1970 年代に当グループで抗真菌物質として発見され[4)]、nanaomycin A は、今なお動物の皮膚糸状菌症治療薬として使用されている。今回、同一生産菌株から PC screening により F, G, H を見出した。Nanaomycin H はその分子内にマイコチオールが付加した化合物で抗真菌活性および細胞毒性は消失していたが、上皮間葉転換が誘導された細胞に対して殺活性を示した。

以上より、物性を指標にした PC screening は放線菌の天然物生産能力を最大限に活用できる方法と考えられた。

1) Biochem Pharmacol.,**134**:42-55 (2017), 2) J Antibiot., **69**:611-615 (2016), 3) J Biosci Bioeng., **123**:765-770 (2017). 4) J. Antibiot., **28**, 860-867 (1975)., *ibid.*, **28**, 925-930 (1975)., *ibid*., **32**, 442-445 (1979).

actinomycete secondary metabolites, physicochemical screening, biological activities

講演番号：2A09p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A09 会場

Isolation and Characterization of Antibacterial Compound from Traditional Indonesia Fermented Soybean

○ Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2] ([1]Unit.Grad.Sch.Agric.Sci., Tokyo.Univ.Agric.Technol, [2]Sch.Agric., Utsunomiya Univ.)

Tempe is well known as soybean *Rhizophus microspores.var oligosporus* fermented product that has high bioavailability. During Fermentation process, many beneficial compound such as antibacterial compound is emerging due to microorganism activity. This experiment's goal is to isolate and characterized antibacterial activity from soybean tempe.

Antibacterial compound was isolated from 72 hour fermented tempe using 99% of ethanol for about 8 hour at 4°C. The ability of tempe extract in inhibiting microorganism growth was tested on 3 strain of bacteria and yeast, which is *Bacillus subtilis.natto*, *Escherichia coli*, *Staphyllococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Antibacterial activity was positively inhibit growth of *B.subtilis.natto* and *S.aureus*, but not on *E.coli* and *S.cerevisiae*. Resistance of antibacterial compound due to heat treatment and proteolytic also tested. Antibacterial activity isolated from tempe is tend to be stable on short heating process and slightly reduce the activity after long heating treatment (1 hour). In the proteolytic test, tempe anti-bacterial was tent to be stable after addition of 500μg/mL trypsin. In the previous research, antibacterial isolatated from tempe was identified as peptide, but from this experiment compound isolated was expected as non-peptide with high hydrophobicity.

Purification of antibacterial compound was performed using High Performance Liquid Chromatography reverse system with water and methanol as mobile phase on 50 to 100 in gradient system. Fractionated compound was collected and tested on 2 kinds of bacteria and found that active compound has retention time around 36 minutes. This compound is emerging due to microorganism activity during fermentation, since only small compound detected in the early fermentation period.

Fermented soybean, Antibacterial, Tempe

発表責任者：Dewi Kusumah（kusumahdewi0402@yahoo.com）

講演番号：2A09p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A09 会場

Streptomyces sp. No. 3 株が生産する水溶性塩基性抗生物質の精製
Purification of hydrophilic and basic antibiotics from *streptomyces* sp. strain No. 3
○阿部 優依奈、荒谷 博、村上 周一郎 (明治大学)
○YUINA ABE, HIROSHI ARAYA, SHUITIROU MURAKAMI (Meiji Univ.)

【背景・目的】
世界保健機関は、2014 年に抗生物質の乱用で抗生物質耐性菌が急増している現状を警告しており、現在抗生物質耐性菌は、世界的な問題になっている。そのため、耐性菌に効果を示す新規抗生物質の探索が必要とされている。本研究室では、*Streptomyces* sp. No. 3 株を用いて新規抗生物質の探索を行っている。これまでに、本菌の生産する抗生物質の特徴として、抗菌スペクトルが幅広いこと、水溶性塩基性物質であることが明らかになっている。[1)] 本研究では、目的抗生物質の構造解析と特性解析を最終目的として、まず目的抗生物質の生産条件の検討と分離を行った。
【方法・結果】
まず、目的抗生物質の生産条件を検討した。C源、N 源、ミネラル、補足剤、他の抗生物質の添加効果を検討したところ、N-アセチルグルコサミンまたはグルコサミンを添加した場合に、抗生物質の生産が有意に増加することが明らかになった。次に、目的抗生物質の精製条件を検討した。陽イオン交換樹脂を用いて脱塩したサンプルを、シリカゲルを用いた TLC に供し、オートバイオグラフィーを行ったところ、Rf 値が 0.25、0.18、0.12 の位置に抗菌活性を有するスポットが得られた。これより、本菌は複数の抗生物質を生産することが明らかになった。次に脱塩したサンプルを Sephadex G-10 および COSMOSIL 140C18-OPN カラムに供し、粗精製を試みた。移動相に水を用いたところ、両方の樹脂において活性画分が溶出されなかったため、目的抗生物質が樹脂に吸着している可能性が考えられた。そこで、移動相として 0.5 M 酢酸アンモニウムを用いて同様の実験を行ったところ、それぞれ活性画分を得ることができた。極性の高い化合物は、比較的様々な樹脂に吸着することで精製を妨げることが知られているが、酢酸アンモニウムを用いることでこの問題を解消することができた。さらに、粗精製したサンプルを HPLC に供し精製を試みた。Mightysil RP-GP18 aqua、Inertsil ODS-3 および NH2P-50-4E を用いて分離したところ、それぞれ R.T. 2.4-4.0 分、3.7-5.5 分および 6.0-9.0 分に抗菌活性を有する画分が得られた。現在はこれらの方法を組み合わせて、目的抗生物質の単離を進めている。単離できた後には、構造解析および特性解析を行う予定である。
1）農芸化学会　2016 年大会、講演要旨 P.624

hydrophilic and basic antibiotics, *Streptomyces*

講演番号：2A09p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌様細菌 Thermosporothrix hazakensis が生産する抗生物質に関する研究

Studies on an antibiotics produced by an Actinomycetes-like bacterium Thermosporothrix hazakensis

○佐藤 実人[1]、天野 昭一[1]、矢部 修平[2]、横田 明[2]、吉成 知也[3]、降旗 一夫[4]、作田 庄平[4]、高野 初美[1]、上田 賢志[1]、高野 英晃[1]([1]日大生資科、[2]東北大院農、[3]国立衛研、[4]東京大院農)
○Minato Sato[1], Shoichi Amano[1], Shuhei Yabe[2], Akira Yokota[2], Tomoya Yoshinari[3], Kazuo Furihata[4], Shohei Sakuda[4], Hatsumi Takano[1], Kenji Ueda[1], Hideaki Takano[1] ([1]Nihon Univ., [2]Grad. sch. Tohoku Univ., [3]NIHS, [4]Grad. Sch. Tokyo Univ.)

［背景・目的］ カビに似た複雑な細胞分化を行う放線菌は、臨床で使用されている抗生物質の約 7 割を生産する工業微生物である。これらの能力は、バクテリアの中では放線菌に特有の性質と考えられ、その分子メカニズムに関する遺伝生化学的な研究が主に *Streptomyces* 属をモデルとして進められてきた。ところが近年、宮城県にある高速発酵堆肥化施設(ハザカプラント)のコンポストより分離された細菌 *Thermosporothrix hazakensis* が、放線菌とは異なる系統に属するにも拘わらず、それに類似した細胞分化能を示すことが報告された。また、ゲノム情報から放線菌と同様に抗生物質などの生理活性物質の合成を担うと予想される遺伝子クラスターを多数保有していることが明らかとなった。昨今、放線菌に由来する新規抗生物質の発見事例が減少するとともに、医薬品開発の現場における探索対象に天然物が占める割合が大幅に削減される傾向にある。一方、これまで探索の対象となってこなかった *Thermosporothrix* とその関連の菌群は、これまでに知られていない化合物を生産する可能性が考えられ、放線菌に次ぐ次世代の有用な探索源として期待される。本研究では、*T. hazakensis* によって生産されることが確認された抗菌活性物質について、その単離と構造解析を行うことを目的とした。
［方法］ *T. hazakensis* を吸着樹脂入りの液体培地を用いて 45℃、4 日間振盪培養した。合計 28 L の培養液に由来する吸着樹脂及び菌体から 50%アセトンにより溶出した後、酢酸エチル抽出し、シリカゲルオープンカラムで分離した。TLC で単一のスポットを確認した後、*Bacillus subtilis* 及び *Geobacillus stearothermophilus* を指標菌として抗菌アッセイし、活性を評価した。得られた物質を HPLC に供し、純度及び UV スペクトルを測定した後、ESI-MS に供し分子量を測定した。また、放線菌を含む数種の菌株に対してもペーパーディスクによる抗菌スペクトラム試験を実施した。
［結果・考察］ 酢酸エチル抽出物より 240 mg の抗菌活性物質を単離した。活性物質は 340 nm に吸収極大を持ち、マススペクトルより分子量は 1600 以上であることが確認された。また、複数の塩素原子を含む二量体構造を有することが示唆された。抗菌スペクトラム試験より、放線菌 *Streptomyces griseus* をはじめとするいくつかのグラム陽性細菌に対し顕著な抗菌活性を示し、*B. subtilis* 及び *G. stearothermophilus* に対する MIC は 0.87 μg/ml であった。一方でグラム陰性細菌 *Escherichia coli* 及び酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対してはグラム陽性細菌に比べ抗菌活性が低いことが確認された。

Antibiotic, Secondary metabolite, Actinomycetes-like bacterium

講演番号：2A09p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A09 会場

Dietzia sp. 1-5 株が生産するバイオサーファクタントに関する研究
Study on biosurfactants produced by *Dietzia* sp. 1-5
○天笠 萌実[1]、細川 千都世[2]、吉田 晴香[2]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Moemi AMAGASA[1], Chitose HOSOKAWA[2], Haruka YOSHIDA[2], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】
界面活性剤は食品工業、化粧品工業などで幅広く用いられており、産業分野において必要不可欠な化学物質である。合成された界面活性剤の中には生分解性が低いものや、分解される過程で環境ホルモン様の作用を示すものがあり、環境汚染の一因となることが問題視されていた。そこで近年、微生物が生産する界面活性剤であるバイオサーファクタント(BS)が注目されている。BS は生分解性の高さと生物毒性の低さを特徴としており、環境修復への応用や新素材としての利用が期待されている。
本研究では、新たな BS 生産菌を得るためにスクリーニングを行い、得られた菌株が生産する BS の構造や特性を明らかにすることを目的とする。
【方法・結果】
畑地から 63 種の土壌を採取し、0.8% NaCl に懸濁させ、上清を pH 5 または 10 に調整した 0.8% トリデカン(C_{13})を含む培地で振とう培養し、生育が見られた試料を 3% C_{13} 培地で培養した。その結果、pH 5 では 3 株、pH 10 では 13 株を得た。得られた菌株を 3% C_{13} 培地で培養し、経時的にサンプリングした培養液を表面張力の評価法である Drop-collapse 法に供した。その結果をもとに純粋分離した BS 生産有望株を 3 株選抜した。この中で、培養液の表面張力が最も低下していた 1-5 株について研究を進めた。
まず、1-5 株の同定を試みた。16S rRNA 遺伝子の解析結果から、1-5 株は *Dietzia maris* と最も高い 98.9%の同一性を示した。また、形態学的試験、カタラーゼ試験の結果から *Dietzia* 属であることが示唆された。しかし、*D. maris* を含む *Dietzia* 属 3 種と 1-5 株の糖の資化性を比較したところ、いずれの種とも一致しなかったこと、また *D. maris* と 1-5 株の固体培地上での性状が明らかに異なっていたことから、本菌を *Dietzia* sp. 1-5 株と称することとした。
次に、1-5 株における BS の生産条件を検討した。炭素源として、*n*-アルカンの種類および glucose が BS の生産に与える影響を調べた。その結果、炭素数 8 から 13 までの *n*-アルカンにおいて、ウンデカン(C_{11})を唯一炭素源とした培地において最も表面張力の低下がみられた。また、唯一炭素源を glucose とした培地では BS を生産しないことが明らかになった。
現在、さらに詳細な生産条件の検討を行っており、生産条件を確立させた後、培養液から BS を単離・精製して構造解析を行う予定である。

biosurfactant, *Dietzia*, *n*-alkane

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：2A09p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A09 会場

Stenotrophomonas maltophilia のシデロフォアタイプの検討
Detection of type of siderophore producted by *Stenotrophomonas maltophilia*
○久富 敦[1]、志波 優[2]、藤田 信之[2]、田中 尚人[1,2] ([1]東京農大院・醸造、[2]東京農大・分子微生物)
○Atsushi HISATOMI[1], Yuh SHIWA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Naoto TANAKA[1,2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ. of Agri, [2]Tokyo Univ. of Agri)

<目的> *Stenotrophomonas maltophilia* は海中や土壌中などの自然環境に広く生育する細菌である。他にも感染患者や稲など鉄豊富である様々な環境からの分離が報告されている。本種は鉄飢餓状態において金属キレート物質であるシデロフォアを産生することが知られている。シデロフォアとは、三価の鉄に対し高親和性を示すキレート物質であり、様々な植物や微生物が鉄欠乏時に産生し、鉄の獲得を行う。その構造はキレート部位の特徴により catecholate、phenolate、carboxylate、hydroxamate の 4 つのタイプに分類される。2013 年、泉は *S. maltophilia* には catecholate type のシデロフォアを産生する株と catecholate type 以外のシデロフォアを産生する株の存在を報告した。本種が様々な環境から分離されていることから、種内でのシデロフォアの多様性および catecholate type 以外の新規のシデロフォアの発見が期待できる。
そこで本研究では *S. maltophilia* が産生するシデロフォアタイプの特定を目的とする。
<実験方法>シデロフォア産生株計 8 株を用いてシデロフォア産生能を確認した。シデロフォア検出試薬である CAS を添加した寒天培地を使用し、クリアゾーンが形成されるか確認を行った。タイプを判別するため catecholate type と phenolate type を検出する Arnow assay と hydroxamate type を検出する Casky assay を行った。Arnow assay は catecholate type が含まれる溶液中では黄色から赤色へと特異的な色の変化を生じる。また phenolate type が含まれる溶液中では黄色が残り続ける反応である。Casky assay は hydroxamate type が含まれる溶液中では無色から紫色へと特異的な色の変化を生じる。また鉄無添加培地での複数回の継代培養を行い、産生されるシデロフォアに影響があるかを調べた。
<結果>供試菌株全てのシデロフォア産生を確認した。タイプ判別において鉄飢餓培養の継代 1～2 回目は黄色から赤色の変化が全株で観察できた。また継代培養を重ねるごとに黄色が残り続ける反応も全株で観察できた。これより鉄飢餓培養の継代初期では catecholate type を鉄飢餓培養の継代後期では phenolate type を確認した。Casky assay ではどの株も色の変化が確認できず hydroxamate type は確認できなかった。Carboxylate type については現在検討中である。本研究によって 2013 年泉が確認した catecholate type のシデロフォアを全株が産生することに加え、phenolate type のシデロフォアも *S.maltophilia* が産生している可能性が高いことが分かった。
泉ら 2013 年度日本農芸化学会年次大会 2C20p15

Stenotrophomonas maltophilia, siderophore

発表責任者：久富　敦（isuta444@gmail.com）

講演番号：2A09p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌 *S. incarnatus* のシネフンギン生産に及ぼす物理・化学ストレスの効果
Stree-induced prodution enhancement of Sinefungin production
○田村 隆、中島 佑里子、根本 理子、稲垣 賢二 (岡山大院)
○Takashi Tamura, Yuriko Nakashima, Michiko Nemoto, Kenji Inagaki (Okayama Univ)

［目的］従来，放線菌の二次代謝産物の増産を図るために，転写因子やプロモータ配列など分子生物学の発想に基づく解析と改変が重点的に取り組まれてきた。近年，NADPH や FAD など補酵素を要求する代謝系酵素の多くは，その立体構造の形成と維持に分子シャペロンなどのタンパク質品質管理機構への依存度が高いことが報告されているが，抗生物質生産にその発想を導入する試みはなされてこなかった。放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質シネフンギンは，S-アデノシル-L-メチオニンの構造アナログであり，メチラーゼ阻害剤を示す研究用試薬としても市販されている。RNA ウイルスの発現過程における mGppp キャッピングを強く阻害するので，ワクシニアウイルス，ヘルペスウイルスに対する強いウイルス増殖抑制活性を示すほかマラリアやトリパノゾーマ原虫などにも強い増殖抑制活性を示す。哺乳類に対する毒性は低く，マウス毒性 LD_{50}185 mg/kg /皮下注射である。シネフンギンの有用性は高いが，放線菌による生産量がごく微量であるために用途開発が進んでいない。本研究では, *S. incarnatus* よるシネフンギン生産量を改善するために酸性培地, 熱処理, エタノール処理, 塩の添加等の様々なストレス条件を検討してシネフンギン増産効果を検討した。
［方法］放線菌 *Streptomyces incarnatus* を液体培地で 10 日間培養して, 培養 4-10 日目の培養液のシネフンギン濃度を, HPLC を用いて測定した。HCl または NaOH を用いて培地 pH を 4.0, 6.0, 8.0 に調製して, 培地 pH のシネフンギン生産への影響を検討した。また, 培地 pH 調節のために用いる酸を HCl, H_2SO_4, H_3PO_4 で検討した。熱ショック処理は 50℃, 60℃, 70℃のヒートブロックにおいて菌体を 1 分間加熱した。エタノールを終濃度 1 mM, 2 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM で液体培地に添加した。さらに 塩ストレス条件を検討するために, NaCl, $MgCl_2$, KCl, $CaCl_2$ を終濃度 100 mM で液体培地も添加した。
[結果・考察]中性, 塩基性培地と比較して酸性培地でのシネフンギン生産量が高く, 硫酸で培地 pH を調節した条件において最も高い生産量が得られた。エタノールの添加による増産効果は認められなかった。高温ストレスでは 60℃, 1 分間の加熱処理でコントロールと比較して約 1.2 倍高生産であった。そして, $CaCl_2$ を終濃度 100 mM で添加して培養した結果, コントロールと比較して約 1.5 倍高生産であった。酸性培地, 熱処理, $CaCl_2$ 添加によるストレスが高いシネフンギン増産効果を示した。カルセイン-AM/EthD-Ⅲによる生/死細胞染色で観察した結果，ストレスの付与により死細胞が一時的に増加するが，シネフンギン生産期に入ると生細胞が培養液中に優占的に増加することが示唆された。

Chaperonine, Nucleoside Antibiotics, Sinefungin

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A09p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A09 会場

無機リン酸による放線菌ホルモンの生産誘導
Production control of a γ-butyrolactone autoregulator by phosphate in *Streptomyces virginiae*
○若松 拓也、木谷 茂、仁平 卓也（阪大・生物工学国際交流セ）
○ Takuya WAKAMATSU, Shigeru KITANI, Takuya NIHIRA (International Center for Biotechnology, Osaka University)

【背景】
放線菌は、多種多様な生理活性物質を二次代謝産物として生産する微生物であり、これら二次代謝産物の生産は、「放線菌ホルモン」と称される低分子化合物によって誘導される。多くの場合、放線菌ホルモンは、対数増殖中期以降に生産され、二次代謝を数 nM という極低濃度にて誘導する。放線菌ホルモンを介した二次代謝制御メカニズムについては、我々の研究をはじめよく解明されてきているが、放線菌ホルモン自体がいかにして生産誘導されるかは、まったく明らかではない。放線菌ホルモンの生産を誘導する因子を特定できれば、放線菌の二次代謝開始機構に分子レベルで迫ることができると考え、本研究では、抗菌物質バージニアマイシン生産菌 *Streptomyces virginiae* を対象として、バージニアマイシン生産を誘導する放線菌ホルモン VB の生合成を調節する因子を同定することを目的とした。

【方法と結果】
放線菌の二次代謝は、培地栄養源と密接に関連するため、特定の培地成分が閾値濃度に達した場合に、VB 生産が開始すると想定した。天然培地では、培地成分の把握が不可能であるため、研究の第一段階として、まず成分を把握でき、かつ生育と VB 生産・バージニアマイシン生産を再現できる合成培地の確立から開始した。天然培地中の培地成分（炭素源と窒素源、無機塩類、ビタミン類、微量元素類）について種々検討した結果、VB 生産とバージニアマイシン生産を再現できる合成培地の確立に成功した。本合成培地について各培地成分の初期濃度を減少させ、VB の生産開始時期と各成分の減少との相関を検討した結果、アミノ酸と糖については全く相関が見られず、これら主要培地成分は VB 生産の誘導因子ではないと結論された。唯一明瞭な相関が見られたのは、無機リン酸であり、無機リン酸の初期濃度を減少させた場合にのみ、VB の早期生産に至ることを見出した。次に、この現象がリン酸の閾値濃度への到達によるものかを検討するため、VB の生産前後における濃度を解析した。その結果、VB 生産の 3 時間前に無機リン酸が枯渇していることを確認した。
これらの結果は、*S. virginiae* においては、放線菌ホルモンの生産が、無機リン酸の濃度減少により誘導されることを示しており、有用生理活性物質の早期生産への応用が期待される。

Streptomyces, γ-butyrolactone autoregulator, phosphate starvation

講演番号：2A09p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A09 会場

未知生合成クラスターの異種発現による新規ポリケタイド化合物の同定
Discovery of a novel polyketide through heterologous expression of an uncharacterized type I PKS cluster
○木谷 茂[1]、パイト アイヴィ[1]、小椋 康平[1]、ウラノバ ダナ[2]、荒井 雅吉[3]、池田 治生[4]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]高知大・農林海洋科学、[3]阪大・薬、[4]北里大・北里生命科学研究所)
○Shigeru Kitani[1], Ivy Grace Umadhay Pait[1], Kouhei Ogura[1], Dana Ulanova[2], Masayoshi Arai[3], Haruo Ikeda[4], Takuya Nihira[1] ([1]Osaka Univ. ICBiotech, [2]Kochi Univ., [3]Osaka Univ., [4]Kitasato Univ.)

【背景】
放線菌は、有用生理活性物質を二次代謝産物として生産する産業微生物である。しかし、意外にも、この優れた物質生産能力の 90%以上が休眠状態にある。この潜在能力を覚醒できれば、限られた生物資源から新たな生理活性物質を効率的に同定できると考えられる。
放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 は、抗結核菌物質 D-サイクロセリンと核酸系抗生物質、青色色素化合物インジゴイジンを生産する。したがって、本菌では、多くの魅力的な二次代謝クラスターが未だ休眠していると考えられ、その転写覚醒により、新規天然物とその生合成系を同時に同定できると期待される。
本研究では、*S. lavendulae* FRI-5 の二次代謝クラスターを、エバーメクチン生産菌の優れた代謝能のみを残した *S. avermitilis* SUKA22 ゲノム縮小株に導入、異種発現させ、未知生合成クラスターがコードする新規化合物を同定することを目的とした。

【方法・結果】
コスミドにクローン化された I 型、II 型、III 型の各 PKS クラスターもしくは NRPS クラスターをゲノム組込型コスミドに変換することにより、*S. avermitilis* SUKA22 株に導入し、その代謝物を解析した。しかし、プロモーターの置換や培地条件の検討を重ねたが、導入に起因する化合物は、いずれの場合も検出されなかった。I 型 PKS クラスターを詳細に解析したところ、ポリケタイド生合成に関与すると考えられる遺伝子群が含まれていなかったことから、導入 DNA 領域を拡大したコスミドを構築し、*S. avermitilis* SUKA22 株に導入した。その結果、完全長の I 型 PKS クラスター導入株に特有の化合物 **1** が検出されたことから、この化合物は未知生合成クラスターに由来すると考え、その化学構造を決定することにした。
培養液 5 L を酢酸エチルにて抽出し、その濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーの順により精製、15.7 mg の化合物 **1** を得た。HRESIMS および各種二次元 NMR スペクトルに基づく構造解析により、化合物 **1** は、共役二重結合と二つの水酸基を含む新規ポリケタイド化合物であることが判明した。本化合物の化学構造に基づき、完全長 I 型 PKS クラスターがコードする生合成系を解析した結果、興味深い生合成反応系が複数、含まれていた。

Streptomyces, polyketide, cryptic compound

発表責任者：木谷茂（kitani@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A09p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A09 会場

抗生物質生産を誘導する SRB ブテノライド型シグナル分子の分子多様性解析

Analysis of structural diversity of SRB butenolide-type signaling molecules that induce antibiotic production

○住吉 美保、手島 愛子、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Miho SUMIYOSHI, Aiko TESHIMA, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

［目的］

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン（LC）およびランカマイシン（LM）を生産し、それらの生合成は抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB（*Streptomyces rochei* butenolide）により厳密に制御されている。SRB は SRB 生合成因子 SrrX によって生合成され、2,3-二置換ブテノライド構造を有している。放線菌全体のシグナル分子に関して、これまでに約 6 割はγ-ブチロラクトン構造と推測されているが、残り 4 割の構造多様性に興味が持たれた。これに関しては、①近年発見されたフラン型や SRB などのブテノライド型、②新規骨格、③シグナル分子非生産、などに大別できる。そこで本研究では、放線菌シグナル分子におけるブテノライド型分子の多様性の検証、新規分子構造の探索、さらには休眠二次代謝の誘導生産を目指した。

［方法および結果］

供試菌として、本学の保存菌株からランダムに 86 株を選択した。まず、SRB の多様性検証のため各供試菌を培養し、代謝産物を酢酸エチルで抽出した。その後、抽出物を*ΔsrrX* 株（KA20 株）に添加培養し LC・LM 生産の回復を調べたが、いずれの供試菌においても回復が認められず、このことから SRB は独特なシグナル分子構造であることが示唆された。また、*srrX* 遺伝子産物の相同性検索を行ったところ、*S. griseofuscus*, *S. cellostaticus* において高い相同性を示し（99%、86%）、いずれも LC・LM を生産した。これら LC・LM 生産菌のシグナル分子は SRB 型であると考えられたため、その特定を行うべく、代謝産物を抽出した。次いで抽出物を精製し、得た画分を用いて添加培養を行ったところ、KA20 株の LC・LM 生産が回復した。MS 解析によってその画分から SRB の存在を確認でき、当該菌株における SRB 生産が強く示唆された。現在、*srrX* 相同性が高い株に注目して同様の解析を行っている。

regulatory gene, signaling molecule, *Streptomyces*

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A09p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* の二次代謝制御系の解析と物質生産への応用

Analysis of secondary metabolites regulatory cascade in *Streptomyces rochei* and its application toward metabolite production

○見﨑 裕也、岩國 美由季、高橋 譲、鈴木 敏弘、木梨 陽康、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○ Yuya MISAKI, Miyuki IWAKUNI, Yuzuru TAKAHASHI, Toshihiro SUZUKI, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の持つ線状プラスミド pSLA2-L 上には、ポリケチド抗生物質 Lankacidin(LC)・Lankamycin(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされている。LC・LM の生産は *tetR* 型抑制遺伝子（*srrA, srrB*）、SARP 型活性化遺伝子（*srrY, srrZ*）、さらにシグナル分子 SRB の生合成遺伝子 *srrX* など、複数の制御遺伝子により制御されている。本研究では、二次代謝生合成制御系の理解と物質生産への応用を目指した。

(1) リプレッサー遺伝子 *srrB* による二次代謝制御系の解析

リプレッサータンパク SrrB は、高い pI 値を有するシグナル伝達分子受容体ファミリーに属しており、*Streptomyces virginiae*（バージニアマイシン生産菌）のバージニアマイシン生産抑制タンパク BarB などと同様に、抗生物質生産を負に制御する役割を持つ。そこで、*srrB* が抗生物質生産に与える影響を調べるため、親株、*ΔsrrB* 株、*ΔsrrAsrrB* を培養し、酢酸エチルを用いて抽出を行なった。酢酸エチル抽出物を HPLC に供し、LC 生産量を比較したところ、*ΔsrrB* 株、*ΔsrrAsrrB* 株共に 5 倍以上も高生産していた。転写・抗生物質生産量の経時変化解析と合わせると、*srrB* は培養後期における抑制を担っていることが示唆された。

(2) 多重制御遺伝子変異による休眠二次代謝の覚醒

srrY, srrC の二重破壊株 YT02 は、通常非生産の化合物（YT02-A, YT02-B）を蓄積することが明らかになった。構造解析を行なったところ、4, 10-dihydroxy-10-methyldodecan-4-olide および 4, 10-dihydroxy-10-methylundecan-4-olide であることが明らかになった。これらはともにγ-ブチロラクトン（GB）骨格を有しており、*Streptomyces avermitilis* のシグナル分子 avenolide と類似した構造を持つ。本発表では、*Strepromyces* 属放線菌のシグナル分子との比較を含めて詳述する。

repressor, regulatory gene, *Streptomyces*

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A09p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A09 会場

Streptomyces griseus 由来 A-factor 受容体 ArpA の発現、精製、結晶化
Expression, purification, crystallization of A-factor receptor protein ArpA derived from *Streptomyces griseus*

○夏目 亮[1,2]、稲葉 龍生[2]、藤田 雄太[1]、若林 玖実[1]、小野寺 真紀[1]、加藤 雄己[2]、和田 英嗣[2] ([1]東電大工、[2]東電大院工)
○Ryo Natsume[1,2], Ryusei Inaba[2], Yuta Fujita[1], Kumi Wakabayashi[1], Maki Onodera[1], Yuki Kato[2], Eiji Wada[2] ([1]Dept. Eng., Toyo Denki Univ., [2]Grad. Scl. Eng., Toyo Denki Univ.)

【目的：A-factor 受容体 ArpA の構造機能相関解析】

放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝および形態分化は、A-factor カスケード系によって制御されている。このカスケード系の鍵を握るのは、微生物ホルモンとも呼ばれる自己調節因子 A-factor とその受容体 ArpA からなる転写制御システムである。同様の転写制御システムは *Streptomyces* 属放線菌類に広く分布しているが、リガンドの構造が一部異なるだけで種間のクロストークは起きない厳密な制御システムとなっている。特異性が極めて高いこのシステムの分子機構の詳細を明らかにする目的で、自己調節因子受容体ファミリーの構造生物学的研究が行われてきた。そのような研究の成功例として、ArpA のホモログである *Streptomyces coelicolor* A3(2)由来の CprB の研究が挙げられる。CprB のリガンドフリー型や DNA 結合型の構造が解析されたことで、自己調節因子受容体ファミリーの構造機能相関について理解が深まった。しかし実は、CprB に関して行われてきた研究には、CprB が認識・受容する自己調節因子が未同定だという、大きな欠点が存在する。受容体による自己調節因子の認識機構については、自己調節因子結合型受容体の構造解析例がないため不明で、議論できないのが現状である。自己調節因子と受容体の間の厳密な特異性はどのように成立しているのか、自己調節因子の結合に伴う受容体のコンフォメーション変換の具体像はどうなっているのか、という問に対する解を得るには、リガンドと受容体の組み合わせが確かなもので行う研究が不可欠で、A-factor と ArpA の組み合わせが理想である。本研究では、ArpA の立体構造情報に立脚して自己調節因子 A-factor とその受容体 ArpA を介した転写制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

【方法および結果： ArpA の発現、精製、結晶化】

発表者らは長年この研究に取り組んできた。だが ArpA は自己調節因子受容体ファミリーの他のタンパク質と比較して取扱いがはるかに難しく、結晶化条件のスクリーニングすら成立していなかった。ArpA を高発現させるのは可能だが、精製や濃縮の際、ArpA は速やかに凝集・沈殿してしまい、結晶化に必要な濃縮試料を調製できないのである。なかなかこの問題を解消できなかったため戦略を見直し、発現系の再構築や ArpA 凝集抑制効果の高い溶液条件の探索などの予備実験を重ねた。その結果、高純度な試料の精製・濃縮・結晶化もできるようになり、A-factor 結合型 ArpA の結晶化条件を確立できた。予備的な回折像測定実験では、最大分解能 2.4Åのデータ収集に成功した。取り扱いが難しいタンパク質の研究事例として、発表では主に結晶化に至るまでの予備実験について紹介する。

Streptomyces griseus, A-factor, ArpA

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2A09p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌の単コロニー化がその生育及び二次代謝に及ぼす影響の解析

Analysis of the effects of single colony isolation on morphology and secondary metabolism in actinomycetes

○森本 諒[1]、丸山 友子[2]、濱渦 亮子[3]、小谷 真也[4]、保坂 毅[1,2,3]([1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研、[4]静岡大農)
○Ryo MORIMOTO[1], Tomoko MARUYAMA[2], Ryoko HAMAUZU[3], Shinya KODANI[4], Takeshi HOSAKA[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [4]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】 放線菌を寒天培地上で単コロニー化すると，色素生産の向上や胞子形成能の低下など，表現型が変化したコロニーが出現することがある．この現象は，放線菌の培養過程でよく目にするが，何に起因するのか，どのような放線菌において起こりやすいのか，詳細については不明である．本研究では，これらの疑問点を明らかにすることを目的とし，様々な種類の放線菌を対象に，単コロニー化が放線菌の生育及び二次代謝に与える変化を検証した．

【方法】 本研究では，13 菌株（*Streptomyces* 属 9 菌株，*Nocardia* 属 1 菌株，*Kitasatospora* 属 1 菌株，*Amycolatopsis* 属 1 菌株，*Nonomuraea* 属 1 菌株）の放線菌を使用した．各供試菌株の凍結保存液を MR5 寒天培地上で単コロニー化し，出現したコロニーの中で最も標準的な培養性状を示すものをスターターとした．スターターの胞子および気菌糸断片（約 100 Colony Forming Units）を，MR5 寒天培地に接種して単コロニー化し，30℃で 7 日間培養した．出現した全てのコロニーを MR5 寒天培地に植え継いでさらに培養し，各コロニーの性質（形状，胞子・気菌糸形成，色素生産性，抗菌物質生産性）をスターターと比較した．

【結果・考察】 供試菌株を上述した方法で単コロニー化したところ，スターターとは明らかに異なる性質を有するコロニーが，13 菌株中 10 菌株で出現した．このことから，放線菌の種類によって，表現型に変化が起こりやすい菌株とそうでない菌株があることが明らかとなった．性質の変化が認められたコロニーが出現した放線菌のうち，*Streptomyces* sp. SUIC-12 では，胞子形成能が低下したコロニーなど様々なタイプが出現し，その出現率は供試菌株中で最も高い 8%を示した．劇的な性質変化が認められたコロニーを対象に，その培養抽出物を HPLC 分析に供して代謝プロファイルを解析したところ，*Amycolatopsis* sp. SUIC-24 をはじめとする 5 菌株で，スターターでは認められない代謝物を生産するコロニーが出現したことも判った．現在，放線菌の単コロニー化でその性質が変化する原因を，遺伝的・分子生理学的観点から詳細に解析している．一方，興味深いことに，*Streptomyces griseus* IFO 13189 を用いた検討では，ストレプトマイシンとは異なる抗菌物質を高生産するコロニーが取得できた．この結果は，放線菌を単コロニー化するという極めて単純な手法が，同菌の潜在的二次代謝産物生産に有効であることを示唆した．

actinomycetes, single colony isolation, secondary metabolism

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A09p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌の二次代謝に対するリンコマイシンの濃度依存的活性化作用の解析

Analysis of the dose-response activating effects of lincomycin on secondary metabolism in streptomycetes

○向井 慶一郎[1]、石塚 美咲[2]、今井 優[3]、下野 和真[1]、保坂 毅[1,2,4] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]ノースイースタン大、[4]信州大バイオメディカル研)
○Keiichiro MUKAI[1], Misaki ISHIZUKA[2], Yu IMAI[3], Kazuma SHIMONO[1], Takeshi HOSAKA[1,2,4] ([1]Fac. Agric. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [3]Northeastern Univ., [4]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

［背景・目的］

放線菌を低濃度（最小生育阻止濃度より低い濃度）のリボソーム攻撃性抗生物質存在下で培養すると，同菌の二次代謝能が劇的に向上することがある．我々の研究室では，リボソーム攻撃性抗生物質がもたらすそのような濃度依存的現象を分子生理学の面から深く解析し，放線菌の二次代謝活性化機構の解明に繋がる手掛かりを掴むことに取り組んでいる．先行研究において，リボソームを標的とする抗生物質のうち，リンコマイシン（LIN）とクロラムフェニコールに強力な二次代謝活性化作用があることを，放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) などいくつかの放線菌を用いた解析で明らかにした．本研究では，*S. coelicolor* A3(2) の二次代謝に対する LIN の濃度依存的活性化作用の仕組みを解明するために以下の検討を行った．

［結果・考察］

S. coelicolor A3(2) を MR5 液体培地で対数増殖期中期まで培養し，5 μg/mL の LIN を添加しさらに培養を続けると，二次代謝の活性化が認められる．この培養条件において，LIN 添加後経時的に回収した菌体から全 RNA や全タンパク質を調製し，遺伝子発現（mRNA およびタンパク質発現レベル）を網羅的に解析した．その結果，LIN 存在下では，先ず LIN の排出に関わる ABC 輸送体の発現量が即座に，かつ劇的に増加し，それに続いて，リボソーム解離因子や 23S rRNA メチル化酵素の発現量が増加し，機能しはじめることが判った．リボソーム解離因子は，LIN が結合して不活性になった 70S リボソームを 50S サブユニットと 30S サブユニットへと解離させ（同時に LIN も脱離），70S リボソームの再構成へと導く役割を果たし，23S rRNA メチル化酵素は，LIN の作用点を修飾することで，LIN が作用し難いリボソームをつくり出す．この一連の動きで，LIN 存在下における *S. coelicolor* A3(2) の細胞は LIN 耐性を獲得するものと考えられた．一方，LIN 添加直後に，リボソームタンパク質 S12 や翻訳伸長因子 G など，多くのリボソーム構成タンパク質や翻訳因子の mRNA 発現量が激減し，同時に，細胞内のヌクレオチド量が増加することも明らかとなった．LIN 耐性になった *S. coelicolor* A3(2) の細胞は蓄積したヌクレオチドを再利用しながら増殖するものと推察される．このことが二次代謝にどのような影響を及ぼすのかを紐付けできれば，LIN による二次代謝活性化の全容解明に繋がると考え，現在，更なる詳細を解析している．

streptomycetes, lincomycin, secondary metabolism

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A09p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A09 会場

放線菌における 23S rRNA 遺伝子変異の特性と二次代謝活性化への関与の解析

Genetic and phenotypic characterization of a *rrn*-23S rRNA mutation and its relationship with secondary metabolism in *Streptomyces* spp.

○星野 颯[1]、今井 優[2]、濵渦 亮子[3]、保坂 毅[3] ([1]信州大総合理工、[2]ノースイースタン大、[3]信州大先鋭領域融合研究群)
○Kanata HOSHINO[1], Yu IMAI[2], Ryoko HAMAUZU[3], Takeshi HOSAKA[3] ([1]Shinshu Univ., [2]Northeastern Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

［背景・目的］ エリスロマイシン(ERY)は，原核生物におけるリボソームの 23S rRNA に結合し，ペプチド転移反応を阻止することでタンパク質合成を阻害する抗生物質である。原核生物では，23S rRNA 遺伝子(*rrn*-23S rRNA)内の突然変異で ERY 耐性の表現型が現れる。先行研究において我々は，*Streptomyces*属放線菌からERY耐性変異株を取得すると，それらの中には二次代謝能が向上した菌株が多く含まれること，加えて，二次代謝の活性化が認められた ERY 耐性変異株の多くは特定の *rrn*-23S rRNA 変異を有することを明らかにした。これらを踏まえ本研究では，*Streptomyces* 属放線菌における *rrn*-23S rRNA 変異の特性と二次代謝活性化への関与を解析したところ，以下に示す新知見を得たので報告する。

［結果・考察］

放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)とその近縁種 *Streptomyces lividans* 66 の自然突然変異体として取得した抗生物質高生産 ERY 耐性変異株は，それぞれ，*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異と *rrnC*-23S rRNA-A2281G 変異を有していた。これら変異を保有する自然突然変異体および人為的に変異導入した形質転換体の ERY 耐性変異株を用いて，各 *rrn*-23S rRNA 変異の特性を詳しく解析したところ，次に示す 1～4 のことが明らかになった。

1. *rrn*-23S rRNA 変異単独では二次代謝の活性化は起こらない(形質転換体 ERY 耐性変異株では抗生物質の高生産が認められなかった)。
2. *nsdA*(negatively affecting *Streptomyces* differentiation)T680G 変異のように単独では二次代謝の活性化を起こさない変異と *rrn*-23S rRNA 変異とが共存すると二次代謝の活性化が起こることがある(自然突然変異体の ERY 耐性変異株が示す抗生物質高生産はこの性質に起因した)。
3. *rrn*-23S rRNA 変異には突然変異の発生を高める作用がある(形質転換体 ERY 耐性変異株から薬剤耐性変異株を取得したところ，その出現頻度が親株に比べて明らかに高かった)。
4. *rrn*-23S rRNA 変異存在下では非存在下では認められないような変異が生じ易くなる(3 の検討において，形質転換体 ERY 耐性変異株から新規変異を多数検出できた)。

以上のことから，*rrn*-23S rRNA 変異が有する特質“突然変異の発生を高める性質”が二次代謝の活性化に間接的に関わることの見通しを得た。*rrn*-23S rRNA 変異のそのような特質が他の放線菌でも普遍的に認められるか否かについては，現在解析中である。

Streptomyces, 23S rRNA mutation, mutation frequency

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A09p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A09 会場

アラレマイシン生産菌の標的酵素ポルフォビリノーゲンシンターゼの解析

Analysis of porphobilinogen synthase (PBGS) from alaremycin producer strain *Streptomyces* sp. A012304

○小林 拓真、上田 沙蘭、岩井 伯隆、和地 正明（東工大生命理工学院）
○Takuma KOBAYASHI, Saran UEDA, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Tokyo Tech.)

【背景と目的】

アラレマイシンは放線菌 *Streptomyces* sp. A012304（生産菌）から発見された抗生物質である(1)。アラレマイシンの構造は、呼吸や光合成を担うヘムやクロロフィルの前駆体である 5-アミノレブリン酸（ALA）と類似しており、２分子の ALA を１分子のポルフォビリノーゲン（PBG）に縮合する酵素、ポルフォビリノーゲンシンターゼ（PBGS）を阻害する(2)。PBGS は PBG を合成する唯一の酵素であるため、多くの生物種で広く保存されている。また、補因子となる金属イオンの違いにより、Mg^{2+}タイプと Zn^{2+}タイプに大別される。ヒトの PBGS は Zn^{2+}タイプであるのに対し、緑膿菌やマラリア原虫などの PBGS は Mg^{2+}タイプであるため、Mg^{2+}タイプの PBGS に特異的に作用する阻害剤の開発が求められる。

これまでに粗抽出液を用いた実験から、生産菌の PBGS はアラレマイシンに耐性であることが示唆されている。そこで本研究では、生産菌の PBGS のアラレマイシン耐性に関与するアミノ酸残基を特定することで、さらなるアラレマイシンの構造変換への知見を得ることを目的とした。

【方法と結果】

生産菌の PBGS に His タグを融合しコリネ型細菌に異種発現させ、Ni レジンカラムにて精製した。精製 PBGS の活性を測定し、アラレマイシンの感受性を評価した。その結果、生産菌の PBGS は Zn^{2+}タイプであることが判明した。また、生産菌だけでなくその近縁の *Streptomyces* 属の PBGS は、緑膿菌などの PBGS に比べアラレマイシンに耐性であることが明らかとなった。様々な種の PBGS のアミノ酸配列のアライメントから、生産菌 PBGS の 280 番目のイソロイシン残基がアラレマイシン耐性に関与していることが示唆された。そこで緑膿菌 PBGS において対応するバリン残基をイソロイシンに置換したところ、アラレマイシンに耐性となった。緑膿菌 PBGS の結晶構造から、このアミノ酸残基は基質結合ポケットの壁を構成しており、バリンからイソロイシンへの置換によりアラレマイシンへの立体障害が大きくなると推測された。今後、他にも耐性に関与しているアミノ酸残基がないか確かめたい。

(1) Awa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, 69:1721-1725.
(2) Heinemann et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2010, 54:267-272.

Alaremycin, porphobilinogen synthase (PBGS), porphyrin

発表責任者：和地 正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2A09p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A09 会場

遺伝子組み換え技術を用いた nocardithiocin 誘導体の作製と機能解析

Characterization of nocardithioicn derivatives constructed by gene modification

○酒井 香奈江[1,2]、酒井 麻衣[3]、川原 聖也[3]、今西 進[3]、原田 健一[3]、五ノ井 透[1]([1]千葉大真菌セ、[2]神戸大イノベ、[3]名城大薬)
○Kanae SAKAI[1,2], Mai SAKAI[3], Seiya KAWAHARA[3], Susumu IMANISHI[3], Kenichi HARADA[3], Tohru GONOI[1] ([1]Chiba Univ., [2]Kobe Univ., [3]Meijo Univ.)

【目的】

Nocardithiocin は、病原性放線菌である *Nocardia pseudobrasiliensis* から分離・同定された thiopeptide 化合物で、抗酸菌に対する抗菌活性を示しており多剤耐性の結核菌にも効果的に作用することが報告されている[1]。このように有用な活性を持つことから新たな治療薬として期待される nocardithiocin であるが、光感受性や水への溶解度が低いことが報告されており、今後の改良が求められている。

既に同定された nocardithiocin の生合成遺伝子クラスターからその生合成が他の thiopeptide 化合物と同様、リボソームで合成されるペプチド鎖が様々な修飾を受けて最終産物になると推定されている[2]。そのため、遺伝子への変異導入により骨格ペプチド(precursor peptide)内のアミノ酸を比較的容易に置換することができそれに伴った誘導体を作ることが可能であると考えた。本研究では遺伝子組み換え技術を用いることで nocardithiocin の誘導体作製を試みた。

【方法と結果】

アミノ酸置換を行うにあたり、野生型の precursor peptide 遺伝子(*notG*)を欠損させた宿主株を作製し、宿主株での nocardithiocin 生産がないことを確認した。本研究では、ペプチド骨格の環化反応に影響が少ないと考えられる位置のアミノ酸 1 つを変異導入によって他の 19 種類のアミノ酸に置換することにした。PCR 法を用いて 19 種類の *notG* 変異 vector と相補用の vector を作製し、それぞれを宿主株に導入した。形質転換体における nocardithiocin あるいはその誘導体の生産を確認したところ、変異入りの *notG* vector を導入することで 19 種類のアミノ酸置換のうち 10 種類のアミノ酸置換で誘導体と思われる物質の生産が確認できた。さらに LC-MS/MS 分析では目的とした誘導体の生産が確認されたのは 6 種類のアミノ酸置換で、目的とした誘導体以外の構造をした物質の生産も見られることが分かった。最後に、作製した物質の光感受性、溶解度、抗菌活性などの性質について変異を入れていない nocardithiocin との比較を行った。

【参考文献】

[1] A Mukai, T Fukai et al. J Antibiot. 62, 613-619 (2009).
[2] K Sakai, H Komaki et al. PLOS ONE, (2015).

Nocardithiocin, Thiopeptides, Derivatives

講演番号：2A10a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A10 会場

アデニル化酵素を利用した芳香族カルボン酸アミドの合成

Synthesis of amide compounds containing aryl carboxylic acids using adenylation enzyme

○佐々木 楓、鈴木 伸、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
○Kaede SASAKI, Shin SUZUKI, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】アミド化合物は医薬品や機能性食品など幅広い分野で用いられる有用な化合物である。現在その合成は化学合成法や酵素法により行われているが、より環境への負荷の少ない酵素法に期待が寄せられている。我々はこれまでに、非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）のアデニル化ドメイン（A ドメイン）を利用したアミノ酸アミドの合成[1)]と、Fatty acyl-AMP ligase を利用した脂肪酸アミドの合成[2)]に成功している。これらアデニル化酵素を用いたアミド合成では、まず ATP 存在下で基質のカルボキシ基が酵素的にアデニル化され、続くアミンによる化学的な求核置換反応の結果アミド結合が形成される。後者の求核置換反応は酵素の基質特異性による制限は受けにくいと予想されるため、異なる基質を認識するアデニル化酵素と組み合わせることで、合成可能なアミド化合物の拡張が可能と考えた。本研究では、芳香族カルボン酸を基質とするアデニル化酵素を利用したアミド化合物の合成を試みた。

【方法・結果】芳香族カルボン酸を基質とするアデニル化酵素として、*Bacillus subtilis* が産生するシデロフォアである Bacillibactin の合成に関与する NRPS の A ドメインの一つである DhbE に着目した。DhbE の生理基質は 2,3-ジヒドロキシ安息香酸であるが、基質特異性を調べるために我々が開発したヒドロキシルアミン比色分析法[1)]を用いて安息香酸とその一置換体について、アデニル化の可否を評価した。その結果、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、アミノ安息香酸、フルオロ安息香酸が基質として認識され、クロロ安息香酸、トルイル酸、フタル酸についてはメタ置換体のみ基質として認識されることが確認できた。そこで、安息香酸を基質として、L-システイン、ヒドロキシルアミン、L-プロリン、ピロリジンを求核剤とするアミド合成試験を行ったところ、いずれの場合も HPLC 分析で新規ピークを確認し、MS 分析でそれぞれ推定されるアミド化合物と一致するピークを確認した。以上より、アデニル化酵素（acyl-AMP-ligase）と求核剤であるアミンとの組み合わせによるアミド結合形成反応は、適用性が高く、アデニル化酵素の基質特異性を反映してアミノ酸アミド、脂肪酸アミド、芳香族カルボン酸アミドなどの有用化合物に対する汎用性の高い合成法を提供可能であることが示された。

1) R. Hara, *et al*., *Analytical Biochemistry*, **477**, 89-91 (2015)
2) 平井ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 講演番号 2C26p10

aryl carboxylic acid amide, adenylation enzyme, NRPS

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：2A10a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A10 会場

アスパラギン合成酵素を利用したβ-アスパルチルアミド合成
β-Aspartylamide synthesis using asparagine synthetase
○鈴木 伸、宇留野 樹生、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
○Shin SUZUKI, Tatsuki URUNO, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】
β-アスパルチルアミドはアスパラギン酸のβ-カルボキシ基がアミド化された化合物であり、その一部は医薬品としての利用が期待される有用物質である。最も単純なβ-アスパルチルアミドであるアスパラギンは、アスパラギン合成酵素によってアスパラギン酸から合成されるが、他のβ-アスパルチルアミドの合成など、その触媒活性に関する情報は少ない。一方、我々は基質のカルボキシ基をアデニル化する酵素反応とアミンによる求核置換反応を組み合わせることでアミド結合が形成されることを見出している。例えば、非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインや acyl-AMP ligese を利用することで、多様なアミノ酸アミド [1]や脂肪酸アミド [2]が合成可能であることを報告している。そこで、β-カルボキシ基のアデニル化活性を有するアスパラギン合成酵素においても、アミンを作用させることで多様なβ-アスパルチルアミドが合成できるのではないかと考え、その可能性について検証を行った。

【方法・結果】
アスパラギン合成酵素は、His-tag 付加型タンパク質として発現させた大腸菌由来 AsnA（EC 6.3.1.1）の精製酵素を使用した。AsnA の基質であるアスパラギン酸に加えて、塩化アンモニウムあるいはヒドロキシルアミン、メチルアミン、トリプトファンをアミンとして添加し、それぞれ ATP および Mg^{2+} 存在下で反応を行った。HPLC 分析の結果、塩化アンモニウムとの反応ではアスパラギンの生成を確認し、他の組み合わせにおいても添加したアミンに対応するβ-アスパルチルアミドと推定される新規ピークを検出することができた。さらに精製した生成物の MS 分析を行ったところ、予想される分子量と一致するピークを検出し、目的とするアミド化合物を確認することができた。本結果より、AsnA にはアスパラギンの合成のみならず、AsnA が有するβ-カルボキシ基のアデニル化活性を利用することで多様なβ-アスパルチルアミドの合成も可能であることを明らかにした。

1) R. Hara, *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 477, 89-91(2015)
2) 平井ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 講演番号 2C26p10

β-aspartylamide, amide bond formation, asparagine synthetase

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：2A10a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A10 会場

組換え大腸菌による乳酸ベースオリゴマーの分泌生産と高分子合成への応用

Secretory production of lactate(LA)-based oligomers and their application to polymer syntheses

○松本 謙一郎[1]、ウツノミア カミラ[1]、堀 千明[1]、田口 精一[2] ([1]北大院工、[2]農大生命科学)
○Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Camila Utsunomia[1], Chiaki Hori[1], Seiichi Taguchi[2] ([1]Eng. Hokudai, [2]Nodai)

【背景・目的】乳酸重合酵素は、ラクチル CoA に活性を有するポリヒドロキシアルカン合成酵素の変異体であり、本酵素を発現する組換え大腸菌は、D-乳酸と D-3-ヒドロキシブタン酸(D-3HB)から成る共重合ポリマーを細胞内に合成・蓄積する。本培養系の培地上清中に、乳酸を含むオリゴマーが微量存在することの発見をきっかけとして、細胞内で重合されたオリゴマーが、細胞外へと「分泌」される可能性が考えられた。そこで、オリゴマーの生産性向上のために、重合酵素の重合停止反応を促進する連鎖移動剤の添加効果を検討すると共に、大腸菌の細胞膜上の分泌経路の探索を行った。さらに、オリゴマーの用途開発のための化学変換について検討を加えた。

【実験】大腸菌に乳酸ベースポリマーの合成に必要な 4 遺伝子(*pct*, *phaC1*$_{Ps}$*(ST/QK)*, *phaA*$_{Re}$, *phaB*$_{Re}$)を含むプラスミドを導入し、LB 培地にグルコース(20g/L)、および連鎖移動剤であるジエチレングリコール(DEG)などを添加し、30°C、48 時間浸透培養した。上清中のオリゴマーを、クロロホルムを用いて二相抽出し、ESI-MS、NMR 等の分析に供した。PI/DAPI 二重染色細胞の蛍光顕微鏡観察により、生菌率を求めた。

【結果・考察】本培養系に DEG を添加すると、オリゴマー合成量が大幅に増加し、5% DEG 添加条件で最大 6 g/L の生産量が得られた。オリゴマーは分子量 400-1400 程度の LA と 3HB の共重合体であり、末端に高い頻度で DEG が結合していたことから、DEG が連鎖移動剤として機能したことが確認された。DEG 添加条件でも、生菌率は 9 割程度でコントロールと差がないことから、オリゴマーが細胞外に存在する理由は、大腸菌の溶菌ではなく分泌であることが分かった。膜タンパク質破壊株による網羅的オリゴマー生産試験により、外膜の輸送に porin が関わっていることが示された。得られたオリゴマーは、触媒的分解によりポリ乳酸の原料となるラクチドに変換でき、また、イソシアネートとの縮合によりポリウレタンが合成できるなど、多様なポリマー合成原料として利用可能であることが分かった。

Lactated-based oligomer, Membrane transporter, Polylactic acid

発表責任者：松本謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A10a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A10 会場

モノマー組成制御された乳酸ベースオリゴマーの分泌生産

Secretory production of monomer composition regulated lactate-based oligomers

○廣江 綾香[1,2]、増永 凛[1]、佐藤 千絵[1]、松本 謙一郎[3]、田口 精一[1,3]([1]東京農大、[2]JST-MIRAI、[3]北大院工)
○ Ayaka HIROE[1,2], Rin MASUNAGA[1], Chie SATO[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Seiichi TAGUCHI[1,3] ([1]Tokyo Agri Univ., [2]JST-MIRAI, [3]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】乳酸ベースオリゴマーは、D-乳酸と D-3-ヒドロキシブタン酸(D-3HB)から成る分子量 1000 程度の重合体である。乳酸重合酵素によって微生物細胞内で重合され、細胞外へと「分泌」される現象が 2017 年に初めて報告された。本研究では、機能性基幹化合物として展開上重要な「重合体のモノマー組成」（乳酸/3HB）比が、微生物培養時に外部添加する連鎖移動剤量によって制御できることを見出した。従来の遺伝子工学・代謝工学的制御とは異なる点で興味深く、本現象の因果関係を明らかにすることを目的とした。
【実験】各種大腸菌に乳酸ベースオリゴマー合成に必要な 4 遺伝子(*pct*, *phaC1*$_{Ps}$*(ST/QK)*, *phaA*$_{Re}$, *phaB*$_{Re}$)を含むプラスミドを導入し、前培養、本培養を行った。本培養では、LB 培地に炭素源となるグルコース(20g/L)、アンピシリン(100mg/L)、連鎖移動剤であるジエチレングリコールなど(0-5 v/v%)を添加し、30^{o}C、48 時間、180rpm で浸透培養した。培養後、遠心により菌体ペレット及び上清を分け、両者に関して各種分析を行った。上清中のオリゴマー量および組成は、酵素法により測定した。細胞内乳酸・3HB 量と組成は、乾燥菌体サンプルの HPLC 分析により算出した。また、培養上清に残存するグルコースや連鎖移動剤量は HPLC により分析した。
【結果・考察】連鎖移動剤であるジエチレングルコールの添加量に伴い、オリゴマー中の 3HB 比が高まった（非添加時：40mol%前後→添加時：90-100mol%）。これまで分泌生産株として用いていた大腸菌 BW25113 株では、乳酸比が高まる傾向にあったが、大腸菌株によってはこれとは逆の効果を示し、同時に 3HB リッチオリゴマーの分泌生産を初めて確認した。細胞内の乳酸/3HB 比を見ると、分泌オリゴマーと同様に、添加量に伴った 3HB 比の増加が確認された。このことから、連鎖移動剤は間接的もしくは直接的に細胞内のモノマーフラックスに影響を与えていることが示唆され、現在より詳細な代謝解析を進めている。

Lactated-based oligomer, Secretory production, Regulation of monomer composition

講演番号：2A10a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A10 会場

転写因子欠失株を用いた乳酸ベースポリマー生産大腸菌のリモデリング
Re-modeling of *E. coli* for enhancing polymer production
○門屋 亨介[1,2]、児玉 悠[3]、松本 謙一郎[3]、大井 俊彦[2,3]、田口 精一[1,2]([1]東京農業大学、[2]JST-CREST、[3]北海道大学)
○Ryosuke KADOYA[1,2], Yu KODAMA[3], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Toshihiko OOI[2,3], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST-CREST, [3]Hokkaido Univ.)

（研究背景）再生可能なバイオマスを原料として微生物合成される多元ポリ乳酸は、生分解性を有することから炭素循環システムに組み込まれる環境調和型プラスチック素材である。これまで、ポリマー生産性の増大や質的向上を目指し、(1)遺伝子発現システムの強化、(2)酵素進化工学、(3)代謝工学、(4)培養工学などが、主要戦略として取り組まれてきた。さらに、これら戦略を組み合わせ、ポリマーの生産性向上が図られてきた。このような背景の下、多元ポリ乳酸合成に優良な形質の探索を目指して、大腸菌を対象にトランスポゾン変異をゲノムワイドに導入したところ、複数の高生産変異株が取得できた。その中でも特に生産量の向上した変異株は、野生株の 1.4 倍の生産量を示した（野生株:5g/L、変異株 7g/L)。この結果は、ポリマー合成に正の影響をもたらす変異がゲノム上に複数存在することを示唆している。

（方法・結果）大腸菌には約 4000 の遺伝子が存在するので、それらを網羅的に解析していくことは現実的ではない。そこで、転写因子に着目した。一つの転写因子は複数の遺伝子発現制御を行っている。全ての転写因子変異株でポリマー生産量解析を行うことで、ほぼすべての遺伝子のポリマー生産への影響を網羅的に解析できると考えた。大腸菌遺伝子データベースより転写に関わる遺伝子群の検索を行った結果、312 存在した。一遺伝子欠失株コレクション（KEIO コレクション）から該当株を選抜後、乳酸ポリマー合成酵素をコードしたプラスミドを導入する。乳酸ポリマー合成経路持った各転写因子破壊株と野生株をグルコース存在下の LB 培地で 30°C、48 時間培養し、ポリマー生産量を HPLC で測定した結果、9 株で生産量が増加していた。ポリマー生産量は、最も生産量が高い株で野生株の 2 倍（野生株:5g/L、転写因子破壊株:10g/L）を示した。これらの結果は、予測通りポリマー生産に正の影響をもたらす変異が数多く存在することを示している。これらポリマー生産に対する優良変異を顕在化して利活用することはポリマー微生物合成の新しい戦略になると考えられる。

polyhydroxyalkanoate, *Escherichia coli*, transcriptional factor

発表責任者：門屋　亨介（rk206546@nodai.ac.jp）

講演番号：2A10a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A10 会場

shinella sp. NN-6 株由来のケトース 3-エピメラーゼの精製、諸性質の検討と D-プシコース生産への応用

Purification, characterization of ketose 3-epimerase derived from *shinella* sp. NN-6 strain and application to D-psicose production

○池田 光[1]、野崎 智帆[1]、堀 玄澄[1]、鈴木 琢磨[1]、森本 兼司[2]([1]香川大院農、[2]国際希少糖研究教育機構)
○Hikaru IKEDA[1], Chiho NOZAKI[1], Gencho HORI[1], Takuma SUZUKI[1], Kenji MORIMOTO[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Research Center.)

〈目的〉
現在、希少糖である D-プシコースの大量生産は D-フルクトースを基質として、D-プシコース 3 エピメラーゼ(D-PE)によって成されている。このような希少糖生産酵素は誘導酵素であるものが多く、微生物を目的の炭素源で培養し、酵素を誘導することが一般的な発現条件となっている。しかし本研究室が保有する *Shinella* sp. NN-6 株は D-プシコースで誘導せずとも D-グルコースにより上記酵素が発現されることが先行研究により明らかになっている。NN-6 株のゲノム解析を行った結果、ケトース 3-エピメラーゼ(K-3E)だと思われるアミノ酸配列が二種類存在していることが分かった。先行研究により D-プシコースで発現する酵素の精製、及び諸性質の検討は成されているため、本研究では D-グルコースで発現する K-3E の精製、諸性質の検討を行い、さらに本酵素の固定化により D-フルクトースから D-プシコースの生産に応用可能かを検討することを目的とした。
<結果、考察>
YE 培地に誘導炭素源として 0.5 %の D-グルコースを添加した培地で NN-6 株を培養し、超音波破砕により粗酵素を抽出した。破砕後の上清を熱処理、硫安分画、HiTrap phenyl カラムクロマトグラフィー、HiTrap Q カラムクロマトグラフィー、Resource Q カラムクロマトグラフィー、Superdex 200 カラムクロマトグラフィーにより K-3E を精製した。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果より、本酵素は約 70kDa の二量体であることがわかった。先行研究により本菌の D-PE は四量体で、本酵素とは異なることが分かった。精製酵素を用いて、諸性質の検討を行ったところ、本酵素の至適温度は 80℃、至適 pH は Tris-HCl の pH 7.5、最適基質は L-リブロースであることが分かった。これらの至適条件も、先行研究の D-PE とは異なることから、NN-6 株は K-3E のアイソザイムを二つ持つことが明らかになった。K-3E のアイソザイムを持つ微生物の報告は初めてであり、本研究の L-リブロース 3-エピメラーゼは、誘導炭素源に D-プシコースを必要としないことから、培養コストを大幅に削減できるため、D-プシコースを安価に生産することができると期待される。そこで本酵素(650U)を HPA25L に固定化後、カラムに充填し D-フルクトース(10%、100mL)を供したところ、約 5 時間で反応が平衡に達した。この結果より、本酵素は D-プシコース生産に十分に応用できることが確認された。

D-psicose, Ketose 3-epimerase, Immobilized enzyme

講演番号：2A10a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A10 会場

Shinella sp. NN-6 由来 D-キシロースイソメラーゼと D-プシコース 3-エピメラーゼを用いた D-キシロースからの D-キシルロース、D-リブロースの一括生産

Simultaneously production of D-xylulose and D-ribulose from D-xylose used D-xylose isomerase and D-psicose 3-epimerase from *Shinella* sp. NN-6

○鈴木 琢磨[1]、堀 玄澄[1]、池田 光[1]、森本 兼司[2] ([1]香川大学農、[2]国際希少糖研究教育機構)
○Takuma SUZUKI[1], Gencho HORI[1], Hikaru IKEDA[1], Kenji MORIMOTO[2] ([1]Kagawa univ., [2]International Institute of Rare Sugar Research and Education)

〈目的〉

近年、希少糖の健康への機能性が注目されている。本研究室で所有する *Shinella* sp. NN-6 は D-キシロースで培養することで D-キシロースイソメラーゼ(D-XI)と D-プシコース 3-エピメラーゼ(D-PE)を同時に発現することが分かっている。さらに、本菌の D-XI を精製し諸性質を調べたところ、本酵素は D-キシロースに対して非常に狭い基質特異性を示すことも分かった。そこで本菌を用いて D-キシロースから、希少糖である D-キシルロースと D-リブロースの一括生産が可能ではないかと考え、生産条件を検討した。

〈方法･結果〉

D-キシロースを炭素源として培養した *Shinella* sp. NN-6 を超音波破砕し粗酵素を得た。粗酵素に核酸除去、熱処理を施した後ポリエチレングリコール#6000(PEG)を氷上で少しずつ添加し、塩析効果により部分精製酵素を得た。D-XI および D-PE の全活性のうちの 90%以上が PEG10-25%画分に確認された。この画分を部分精製酵素とし、至適温度と至適 pH を検討した。D-XI の至適温度は 60℃、D-PE は 80℃となった。また、D-XI の至適 pH はリン酸ナトリウム緩衝液の pH 8.0、D-PE は同緩衝液の pH 6.0 であった。

部分精製酵素を陰イオン交換樹脂 HPA25L と混合し 4℃で一晩、定期的に撹拌しながら固定化した。D-XI(25.2 U)、 D-PE(20.8 U)に対して HPA25L 0.4 g を加えたとき、固定化率は両方ともに約 84%であった。反応系 3 mL に基質として 20% D-キシロース、固定化酵素 0.1 g、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いて 55℃でバッチ反応をさせた。この条件下において反応約 10 時間で平衡に達し、平衡比は D-キシロース:D-キシルロース:D-リブロース=78:16:6 となった。これにより D-キシロースから一括で D-キシルロースおよび D-リブロースを生産できることが確認された。

Shinella sp. NN-6, D-Xylose isomerase, D-Psicose 3-epimerase

講演番号：2A10a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A10 会場

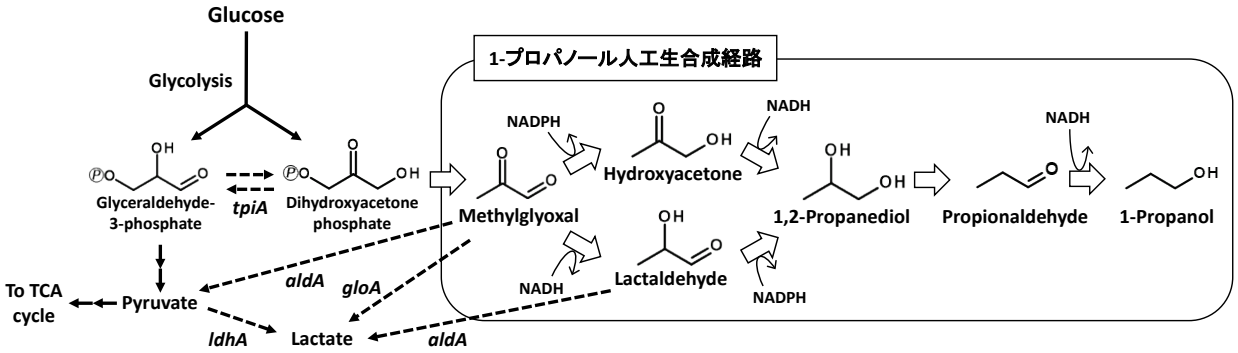
1-プロパノール発酵生産のための組換え大腸菌の代謝改変に関する研究

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for fermentative production of 1-propanol

○長谷川 亮、松原 充、服部 佑紀、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Ryo HASEGAWA, Mitsuru MATSUBARA, Yuki HATTORI, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの原料として利用できる化合物である．1-プロパノールをバイオマスから生産することができれば，バイオマスからのポリプロピレン生産が可能となり，長期的な CO_2 固定の面で大きな効果が期待できる．先行研究により，下図に示すような 3 段階の NAD(P)H 依存性カルボニル還元反応を含む 1-プロパノール人工生合成経路を導入した組換え大腸菌が創出された．しかし，1-プロパノール生産培養時に経路中間物質であるヒドロキシアセトン（HA）の著量な蓄積が見られた．そこで本研究では，HA の蓄積が補酵素 NADH の供給量不足と仮定し，HA 蓄積の改善を目的として種々の検討を試みた．

【方法・結果】1-プロパノール生産菌に対して，大腸菌内在性のニコチン酸からの NAD^+ 合成経路の律速酵素をコードする *pncB* 遺伝子と，NAD^+ と NADPH から NADH と $NADP^+$ への変換反応を触媒する *pntAB* 遺伝子をそれぞれ導入した．宿主には 1-プロパノールの収率低下の要因となる *gloA*, *aldA*, *ldhA*, *tpiA* 遺伝子の破壊株である PR07 株を用いた．その結果，いずれの遺伝子導入株においても HA の蓄積が改善された．*pntAB* 導入株では細胞内の NADH / NAD^+ 比が増加し，嫌気培養において消費グルコースに対する 1-プロパノールの収率が導入前の 0.73 mol/mol から 0.88 mol/mol に向上した．また *pncB* 導入株では細胞内の NADH / NAD^+ 総量が増加し，好気あるいは嫌気培養において，HA の蓄積が完全に解消された．さらなる収量の増加を図るために，培地中に通気する空気と窒素の混合比を制御可能なジャーファーメンターを用いて *pncB* 導入株の培養を行った．その結果，空気：窒素＝75：25 の通気条件において最大 77.8 mM（4.7 g/L）の 1-プロパノールが生成し，試験管培養における 1-プロパノールの生成量（36.1 mM）を大きく上回った．現在，収量や収率の増加など生産性改善のため様々な検討を行っている．



1-propanol, *Escherichia coli*, metabolic engineering

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A10a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A10 会場

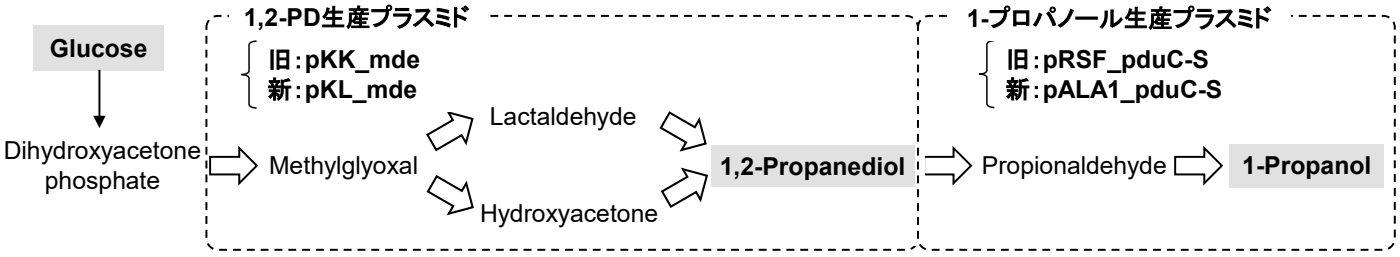
組換え大腸菌を用いた 1-プロパノール発酵生産のための酵素遺伝子発現系の構築

Construction of enzyme gene expression system for 1-propanol production using recombinant *Escherichia coli*

○松原 充、服部 佑紀、長谷川 亮、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Mitsuru MATSUBARA, Yuki HATTORI, Ryo HASEGAWA, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの原料として利用できる化合物である．先行研究により，1,2-プロパンジオール（1,2-PD）生産プラスミド pKK_mde と 1-プロパノール生産プラスミド pRSF_pduC-S から構成される 1-プロパノール人工生合成経路（下図）が設計され，これを導入した組換え *Escherichia coli* によるグルコースからの 1-プロパノール発酵生産が可能となった．しかし，pRSF_pduC-S を *E. coli* に導入した場合，得られた株の大部分は 1,2-PD を 1-プロパノールに変換できず，変換能力を持つ株は僅かにしか得られなかった．そこで本研究では, 1-プロパノール生産菌の安定的な取得を目的として酵素遺伝子発現系の改良を試みた．

【方法と結果】まず，変換能力を持たない株が保持するプラスミドの解析を行ったところ，1,2-PD からプロピオンアルデヒドへの変換を触媒するジオール脱水酵素遺伝子の塩基配列中に変異が生じていることが分かった．pRSF_pduC-S は発現強度の高い *tac* プロモーターを持つ高コピー数プラスミドであるため，プラスミド上の酵素遺伝子が構成的かつ強力に発現し，それによる代謝負担を回避するために変異が誘発されたのではないかと推定した．そこで変異を回避するため，改良型 1-プロパノール生産プラスミドとして， *lacI* 遺伝子と発現強度の低い A1lacO-1 プロモーターを持つ低コピー数の pALA1_pduC-S を新たに構築した．pALA1_pduC-S を *E. coli* に導入したところ，pRSF_pduC-S を導入した場合と比較して, 1,2-PD を 1-プロパノールに変換できる株の取得率が飛躍的に増加した．さらに，*lacI* 遺伝子を追加導入した改良型 1,2-PD 生産プラスミド pKL_mde を作製し，pALA1_pduC-S と組み合わせて *E. coli* に導入した．この新規発現系（pKL_mde と pALA1_pduC-S）を導入した株を用いて 1-プロパノール生産培養を行った結果，グルコースに対する 1-プロパノールの収率が最大 0.93 mol/mol となり，同条件で旧発現系（pKK_mde と pRSF_pduC-S）を用いた場合（最大 0.67 mol/mol）よりも収率の面で大幅な改善が見られた．



1-propanol, *Escherichia coli*, diol dehydratase

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A10a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A10 会場

Fusarium sp. No.17 株由来のアクリル酸水和酵素に関する研究

Purification and characterization of acrylic acid hydration enzyme from *Fusarium* sp. No.17

○堀部 優太、柳川 顕秀、西川 恵美、西本 菜津紀、松原 充、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Yuta HORIBE, Akihide YANAGAWA, Megumi NISHIKAWA, Natsuki NISHIMOTO, Mitsuru MATSUBARA, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】

アクリル酸はポリマー原料として広く利用されている化合物の 1 つであり、もっとも単純な不飽和カルボン酸として分子内に炭素間二重結合を有している。我々はアクリル酸の炭素間二重結合の変換を触媒する微生物由来の酵素の探索と応用に関する研究を進めている。これまでの研究により、アクリル酸を 3-ヒドロキシプロピオン酸(3HPA)へと水和する *Fusarium* sp. No. 17 株の単離に成功した。さらに無細胞抽出液（CFE）での反応にアセチル-CoA（Ac-CoA）が必須であったことから、本変換反応はアクリリル-CoA（Acrl-CoA)、3-ヒドロキシプロピオニル-CoA（3HP-CoA）を経由した 3 段階反応であることが示唆された。本研究では目的酵素の発現量が増加する培養条件を検討した後、菌体から酵素を精製し、精製酵素を使用して目的酵素の諸性質を調べた。

【方法・結果】

酵素の発現量を増加させるために、培養時のアクリル酸の添加の有無と培養日数による影響を CFE を用いた反応で調べた。その結果、アクリル酸添加・本培養 3 日の条件で最もアクリル酸水和活性が高いことが明らかとなり、上記の培養条件を最適な条件と決定した。

次に、菌体を超音波破砕して作製した CFE から酵素精製を行った。初期精製として硫安分画を行った後、陰イオン交換カラム・疎水性カラム・ゲル濾過カラム等各種カラムを用いたクロマトグラフィーで精製を行った。その後 SDS-PAGE で最終精製画分を分析した結果、約 57 kDa 部分にほぼ単一のバンドが確認された。また、ゲル濾過カラムで既知分子量のタンパク質を複数種類流し、検量線を引いた結果、目的酵素の分子量が約 56 kDa と算出されたことから、目的酵素はモノマータンパク質である可能性が示唆された。

さらに、目的酵素の諸性質を調べるために、精製酵素を用いて各種条件で活性測定を行った。その結果、初期に反応液に添加していたマグネシウム、カリウム、DTT の有無は酵素活性にほとんど影響しないこと、および Ac-CoA の添加が必須であることが確認された。また、反応温度 35℃、pH 7.0 でそれぞれ最も高い活性を示すことが確認された。現在、シーケンサーによる精製酵素の N-末端配列解析を進めている。また、基質特異性や温度安定性なども調べている。

Fusarium, acrylic acid, 3-hydroxypropionic acid

発表責任者：片岡　道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A10a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A10 会場

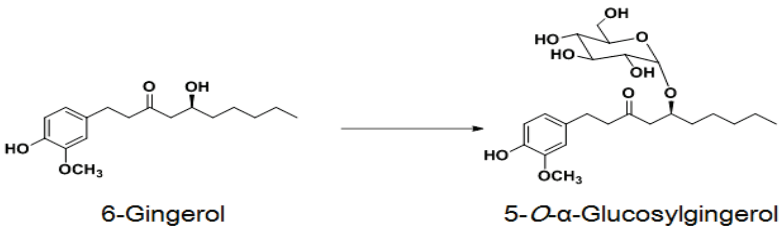
ショウガ搾汁液中の 6-ジンゲロールの微生物反応による配糖化に関する研究
Microbial glucosylation of 6-gingerol from ginger juice.
○鈴木 達也[1]、松本 里佳[1]、佐藤 浩志[2]、上田 誠[1] ([1]小山高専物質工学科、[2]日生バイオ株式会社)
○Tatsuya SUZUKI[1], Rika MATSUMOTO[1], Hiroshi SATOH[2], Makoto UEDA[1] ([1]National Institute of Technology, Oyama College, [2]Nissei Bio Company)

【目的】ショウガ活性成分の 6-ジンゲロールには殺菌作用、脂肪蓄積防止作用などの生理作用がある。しかし、6-ジンゲロールは水に不溶であり、また強い辛味と刺激臭を持つことから 6-ジンゲロールの応用分野並びに使用量は限定されている。一般にポリフェノール類は配糖化することにより水溶性や刺激性の改善が可能である。そのため、昨年度までに土壌細菌による 6-ジンゲロールの微生物配糖化の検討を行い、活性株 *Ensifer sp.* M-26 株による微生物反応で 5-α-Glc-gingerol を生成することを報告してきた[1,2]。今回は、*Ensifer sp.* M-26 株の特性を継続して検討し、くわえてショウガ搾汁液を原料とした配糖化の検討を目的とする。

【方法】微生物の培養はスクロース等の糖質を主炭素源とする培地でジャーファメンターにより培養し、洗浄菌体を調整し反応に用いた。ショウガ搾汁液への反応の検討は反応初速度を求めることにより行った。生成 5-α-Glc-gingerol やショウガ搾汁液の分析は TLC および HPLC を用いた。

【結果】*Ensifer sp.* M-26 株のジャーファメンターによる増殖と配糖化活性の関係を検討した。その結果、15.5～20.5 時間培養した菌が高い配糖化活性を示した一方、菌の増殖は 40 時間付近で定常期に達した。ショウガ搾汁液の各種ジンゲロールを定量分析した。各成分の濃度は 6-ジンゲロール 0.33 g/L、8-ジンゲロール 0.037 g/L 、10-ジンゲロール 0. 065 g/L であり、また 6-ショウガオール 0.01 g/L であった。ショウガ搾汁液を用いた経時的な変換反応では、反応 10 時間で 5-α-Glc-gingerol が蓄積され、6-ジンゲロール初期濃度に対するモル収率は 19 %であった。また、その他の諸反応等についても報告する。

1) R. Matsumoto, H. Satoh, M. Ueda, J. Mol. Catal. B, 133, S200-S203 (2016)
2) 特許 6156947 号



Ensifer adhaerens, 6-gingerol, ginger

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：2A10a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A10 会場

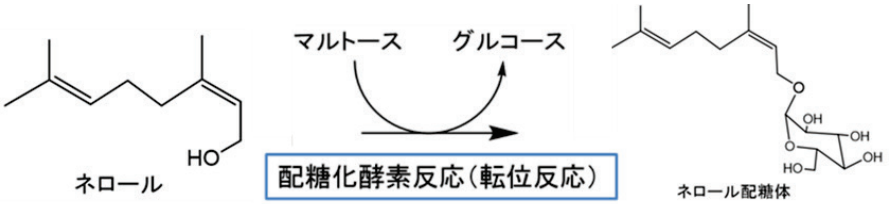
微生物反応によるネロールの配糖化に関する研究
Production of neryl-α-D-glucopyranoside via glucosylation of nerol.
○高橋 一樹[1]、寺内 一星[1]、小野 満里江[1]、佐藤 浩志[2]、上田 誠[1] ([1]小山高専物質工学科、[2]日生バイオ株式会社)
○Kazuki TAKAHASHI[1], Issei TERAUCHI[1], Marie ONO[1], Hiroshi SATOH[2], Makoto UEDA[1] ([1]National Institute of Technology, Oyama College, [2]Nissei Bio Company)

【目的】当研究室ではこれまでに 2 級アルコールであるショウガ活性成分の 6-ジンゲロールの配糖化を報告してきた[1)]。その研究段階で *Agrobacterium* sp. M-12 株が、テルペンアルコールであるネロールを効率よく配糖化することを見出した[2)]。バラ花精油中の主成分であるネロールは、抗菌、防虫作用など様々な作用を持ち、医薬品、食品、嗜好品などにおいて主に香料として利用されているが、水溶性が低く、揮発性が強いため保存安定性に欠けるという欠点がある。そこで、配糖化によりネロールの性質を改善し、従来の用途以外への利用の拡大を目指す。本研究は、ネロール配糖化活性を有する微生物のさらなる探索と、マルトースをドナーとするネロールの配糖化反応の特性解明を目的とした。

【方法】土壌から分離した微生物をマルトースを主炭素源とする液体培地で培養し、反応基質を途中添加し反応させた。反応生成物の分析は TLC と HPLC を用いて行い、活性株は 16S rDNA 塩基配列解析により同定した。反応検討はマルトースを主炭素源とする培地で培養した洗浄菌体と、ネロールをマルトース溶液に完全に溶解させた反応液で行った。生成したネロール配糖体は分離精製し NMR による構造決定を行った。

【結果】ネロール配糖化菌株の探索の結果、*Arthrobacter* sp. 238 株を得た。さらに、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR による構造決定により、*Agrobacterium* sp. M-12 株により合成したネロール配糖体は neryl-α-D-glucopyranoside であることを確認した。また、 *Agrobacterium* sp.M-12 株を用いた炭素源の検討ではマルトース培地で得た菌体の活性が最も高かった。経時的な反応の様子、反応の至適条件、反応液から精製した neryl-α-D-glucopyranoside の物性等のデータについては現在取得中である。

1) R. Matsumoto, *et al.* J. Mol. Catal. B, S200-S203 (2016)
2) 特開 2017-123844



Agrobacterium, nerol, glucosylation

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：2A10a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A10 会場

食品用酵母の物質変換能力を利用した環境浄化の試み

Trial of environment cleaning using food yeast that has ability of material conversion

○深海 あすか、斎田 陽介、尾形 智夫（前橋工科大生物工）
○Asuka FUKAUMI, Yousuke SAITA, Tomoo OGATA (Maebashi Inst. Tech.)

（目的）*Saccharomyces cerevisiae* 等の食品用酵母は、長い期間使用され、その安全性が信頼されている微生物である。食品用酵母の物質変換能力を利用して、環境浄化をおこなうことが可能となると、食品工場の価値向上に寄与できることが期待される。食品工場排水中のデンプンや発酵食品の老化臭物質で、セルロースバイオマス分解産物で発酵阻害物でもあるフルフラールの食品用酵母での分解による環境浄化への試みをおこなった。

（方法）食品用酵母として、*S. cerevisiae* S288C、グルコアミラーゼ産生酵母 *S. cerevisiae var. diastaticus* NBRC1046 等を用いた。デンプンの分解は、1%可溶性デンプン、0.25%酵母エキスのモデル食品排水の処理後の COD を過マンガン酸カリウム消費量で測定した。フルフラールの分解は、5μg/ml フルフラール含有 YPD 培地で処理した後、逆相 HPLC を用いて測定した。

（結果）酵母 *S. cerevisiae* S288C を用いたところ、グルコアミラーゼ無添加の場合は、処理液の平均 COD は 1935 であったのに対し、グルコアミラーゼ添加の場合、平均 COD は 1421 であり、危険率 1%で有意差があった。処理後の酵母細胞数は、グルコアミラーゼ無添加の場合は、平均 5.3×10^6 cells/ml であったのに対し、グルコアミラーゼ添加の場合、平均 3.0×10^7 cells/ml であった。このことより、グルコアミラーゼを添加することで、モデル食品排水中のデンプンが、グルコース等に分解され、酵母が増殖し、処理が進んだと推察した。グルコアミラーゼ産生酵母 *S. cerevisiae var. diastaticus* NBRC1046 を用いたところ、処理前の培養を、グルコアミラーゼ誘導培地である、グリセリン－乳酸培地にしたところ、デンプン処理液でグルコアミラーゼ活性が検出され、グルコアミラーゼ非産生酵母 *S. cerevisiae* S288C の処理液の平均 COD は 1954 であったのに対し、グルコアミラーゼ産生酵母の処理液の平均 COD は 1800 であり、危険率 1%で有意差があり、グルコアミラーゼ無添加であっても、デンプンを含む食品排水を酵母で処理できる可能性が示された。また、フルフラールの食品用酵母による分解では、試みた酵母株すべてで、検出限界（0.1 μg/ml）以下となり、発酵食品の老化臭物質で、セルロースバイオマス分解産物でもあるフルフラールの食品用酵母による分解も可能であると考えられた。本研究は、住友財団 2016 年度環境研究助成として、また、JST マッチングプランナープログラム「探索試験」平成 27 年度第一回課題として実施したものである。

yeast, environment cleaning, material conversion

発表責任者：尾形　智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2A10a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A10 会場

エキソ型アルギン酸リアーゼによる多糖アルギン酸の分解物 DEH はアミノ基と非酵素的に反応する

A monouronate (DEH) is produced by digestion of alginate by exo-type alginate lyase and reacts with amino gruop.

○中田 翔太[1]、松岡 史也[2]、柏原 貴幸[2]、村田 幸作[3]、橋本 渉[1,2]、河井 重幸[1,2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]摂南大理工)
○ Shota NAKATA[1], Fumiya MATSUOKA[2], Takayuki KASHIHARA[2], Kousaku MURATA[3], Wataru HASHIMOTO[1,2], Shigeyuki KAWAI[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Sci. & Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】広大な排他的経済水域を有する日本では、褐藻類などの海洋バイオマスを原料とした有用物質の生産技術の確立が重要である。当分野では、褐藻類に多く含まれる多糖アルギン酸並びにマンニトールを原料とした、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いる有用物質の生産を目指している。アルギン酸にエキソ型アルギン酸リアーゼを作用させると、不飽和モノウロン酸まで分解された後、非酵素的に開環することによって 4-deoxy-L-*erythro*-5-hexoseulose uronate (DEH) が生成する。当分野ではこれまでに、DEH とマンニトール資化能を付与した出芽酵母の作出に成功している [1)]。DEH は、アルギン酸水溶液にエキソ型アルギン酸リアーゼ Atu3025 [2), 3)] を作用させて調製している。なお、この反応液を TLC によって分離した後、生成した DEH を硫酸発色あるいは TBA 発色によって検出している。

Atu3025 は当分野で特定されたエキソ型アルギン酸リアーゼである [2)]。既報 [2)] に記載の、Atu3025 の活性測定時の酵素反応液の TLC 分離後の発色パターンは、上記の DEH 調製時の発色パターンとはなぜか異なっている。また、Hobbs らにより、不飽和モノウロン酸から DEH への開環が KdgF によって触媒されることが報告された [4)]。これらの知見から、アルギン酸水溶液に Atu3025 を作用させた時に生成されるのは、DEH ではなく、開環前の不飽和モノウロン酸である可能性が考えられた。一方、DEH 資化能を付与した出芽酵母を、DEH を単一炭素源とする培地で培養する際に窒素源として硫酸アンモニウムを使用すると本酵母が生育しないという現象を確認している（未公表データ）。

【方法と結果】DEH 調製時と Atu3025 の活性測定時の条件の違いは、後者に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) が含まれている点である。そこで、調製した DEH に Tris-HCl (pH 7.5) を 50 mM となるように加えて保温 (30℃、一晩)した。この反応液を TLC によって分離し、スポットを硫酸発色及び TBA 発色で確認したところ、確かに Tris-HCl (pH 7.5) の混入によって発色のパターンが変化した。同様の操作を様々な種類及び pH の緩衝液を用いて行ったところ、pH の違いではなく Tris によって発色パターンの変化が引き起こされることが分かった。また、硫酸アンモニウム及び塩化アンモニウムを用いたところ、アンモニウム塩の混入によっても発色パターンが変化した。各種アミノ酸を用いた場合、特定のアミノ酸でのみ発色パターンが変化した。続いて、アルギン酸水溶液から調製した DEH に、DEH を基質とする酵素 A1-R'を作用させたところ、調製した DEH が A1-R'の基質となっていることが TLC 分析によって確認された。以上の結果から、アルギン酸水溶液にエキソ型アルギン酸リアーゼ Atu3025 を作用させることによって確かに DEH が生成されており、また、DEH はアミノ基を有する化合物と非酵素的に反応し、別の化合物に変化していると考えられた。

【参考文献】

1) F. Matsuoka *et al*. (2017). *Sci. Rep.* 7, 4206, DOI:10.1038 /s41598-017-04481-3.
2) A. Ochiai *et al*. (2006). *Res. Microbiol*. 157, 642–649.
3) M. Hirayama *et al*. (2016). *Int. J. Biol. Macromol*. 86, 519-524.
4) J. K. Hobbs *et al*. (2016). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113 (22), 6188-6193.

macroalgae, alginate, marine biomass

発表責任者：河井重幸（kawais@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A10 会場

セルロース分解海洋細菌 Gilvimarinus japonicus が生産する多糖分解酵素の解析
Polysaccharide-degrading activity of Gilvimarinus japonicus
○上妻 昌生、藤井 克彦（山口大農）
○Shosei KOUZUMA, Katsuhiko FUJII (Yamaguchi Univ)

【目的】
セルロースは地球上で最も豊富なバイオマスであり、多くのセルロース分解微生物がこれまでに陸上（土壌等）から分離されてきた。他方、海洋に棲息するセルロース分解微生物については、陸上の株と比較して研究例が少ない。演者らは日本海沿岸で採集したロープ片よりセルロース分解細菌（12-2 株）を分離した。解析の結果、分離株はこれまでに 4 種しか報告例のない海洋細菌 *Gilvimarinus* 属の新種であり、*Gilvimarinus japonicus* と命名された。そこで本研究では分離株の海藻分解能および多糖分解酵素の活性等について検討した。

【実験方法】
人工海水に窒素源（NH_4Cl、KNO_3）、リン源（グリセロールリン酸）を溶解し、これにろ紙または海藻（アオサ）を炭素源として加えたものを培養液とした。この培養液で 12-2 株を 25℃で 2 週間培養した。培養後の菌液を遠心分離し、硫酸アンモニウムによる塩析と限外ろ過を経て、菌液中に分泌生産された酵素を回収した（以下、酵素カクテルと呼ぶ）。基質多糖の加水分解反応で生じた還元糖を定量することで、酵素カクテルに含まれる多糖分解酵素の活性を検討した。他方、細胞表層に分解酵素が存在するかを検討するために、遠心分離で得られた菌体沈殿の懸濁液を酵素カクテルの代わりに用いて同様の試験を行った。

【結果】
Gilvimarinus japonicus 12-2 株の培養上清からはエンドセルラーゼ活性が検出されたが、エキソセルラーゼ活性は認められなかった。またラミナリナーゼ活性も検出され、海藻繊維に加えて貯蔵多糖に対しても分解能を持つことが示唆された。他方、寒天シャーレで培養した場合にコロニー周辺部の陥入が見られることからアガラーゼ活性の検出を期待したが、酵素活性は確認できなかった。活性測定の条件を再検討する必要がある。さらに、これらの酵素活性には菌体沈殿の懸濁液で検出されたものもあり、分泌生産に加えて膜結合型の酵素が存在する可能性が示唆された。
培養上清液の電気泳動で見られたタンパク質バンドをペプチドシーケンスで解析した結果、海藻多糖の分解に関わると思われるアミノ酸配列を持ったものを見出すことができた。

Gilvimarinus, cellulase, polysaccharide hydrolysis

講演番号：2A10p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A10 会場

S-GAM 法によるメタゲノムからの新規 SMO 類縁遺伝子の取得・解析

Isolation of homologous genes of styrene monooxygenase from metagenomes by S-GAM method

○戸田 弘、伊藤 伸哉（富山県大・生工研セ）
○Hiroshi TODA, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】　産業用酵素の多くは、環境中よりスクリーニングされた微生物などから取得・利用されているが、環境中の微生物の 99%以上は培養が困難である難培養性微生物であることが示唆されている。すなわち、環境中に眠る有用酵素遺伝子の大部分を取りこぼしている可能性が高い。そこで近年では、目的とする酵素遺伝子を環境 DNA(メタゲノム)から直接取得する試みが盛んになされている。これらの手法では、メタゲノム DNA を断片化した後にコスミドライブラリーや BAC ライブラリー化し、活性スクリーニングや大規模シーケンスにより選抜する手法が主流である。しかし、これらの手法は目的酵素の取得効率が著しく低く、より効率的な目的遺伝子取得法の開発が望まれる。本研究では、PCR を基盤技術とした手法(S-GAM 法)を開発し [1)]、メタゲノムからのスチレンモノオキシゲナーゼ類縁遺伝子の効率的な取得を試みた。

【方法と結果】　既知 SMO の遺伝子配列を元にアライメントを作成し、縮重プライマーを作成した。土壌や堆肥などから抽出したメタゲノム DNA を鋳型として nested PCR を行い、約 1 kb の増幅断片を得た。この増幅断片を In-Fusion 法により *Rhodococcus* sp. ST-10 由来 SMO(RhSMO)とのキメラ酵素となる形でクローニングし、*E. coli* BL21(DE3)へ導入しライブラリー化した。得られた約 3,400 クローンからランダムに 300 クローンをピックアップしシーケンス解析を行った結果、約 250 クローンがモノオキシゲナーゼ遺伝子に対し相同性を示した。またこれらのクローンから、配列が重複するものおよび RhSMO と完全に一致する配列を除いた結果、約 150 クローンが新規かつオリジナルなモノオキシゲナーゼであることが明らかとなった。これらのクローンに対し、インドール酸化反応によるインディゴ生成試験を行った結果、33 クローンにおいて青色のコロニーが形成し、インディゴの蓄積が起きていることが確認された。またこの 33 クローンに対してスチレン変換試験を行ったところ、28 クローンにおいてスチレンモノオキシゲナーゼ活性が確認された。これらのうち比較的(*S*)-スチレンオキシド生成能が高かったクローンを用いて、各種スチレン誘導体に対する基質特異性および立体選択性を検討した結果、複数のクローンにおいて RhSMO とは異なる基質選択性や立体選択性を示した。特に、RhSMO では低い鏡像体過剰率(*ee*)を示す 2-methylstyrene を基質としたとき、複数のクローンが 90% *ee* を超える鏡像体過剰率を示した。この結果から、本手法が多様性に富む SMO 類縁遺伝子ライブラリーの構築とスクリーニングに効果的であることが示唆された。

1) Itoh et al., Appl. Environ. Microbiol., 80, 6280 (2014)/Erratum 82, 61 (2016).

metagenome, styrene monooxygenase, S-GAM

発表責任者：戸田　弘（htoda@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A10p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A10 会場

Komagataeibacter medellinensis のラクトース酸化活性は高ラクトース濃度で誘導される
Lactose oxidising acticity of *Komagataeibacter medellinensis* is induced under high lactose concentration

○桐生 高明、木曽 太郎、駒 大輔、田中 重光、村上 洋（大阪産業技術研究所　森之宮センター）
○Takaaki Kiryu, Tarp Kiso, Daisuke Koma, Shigemitsu Tanaka, hiromi Murakami (Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology)

（背景と目的）ラクトースを酸化すると還元末端にカルボキシル基が導入されたラクトビオン酸が生成する。我々は企業との共同研究により酢酸菌がラクトースを酸化することを明らかにし、酢酸菌の菌体を利用したラクトビオン酸生産法の実用化に成功した。ラクトビオン酸は小腸でのカルシウム吸収を促進するなどの機能性が知られており、機能性食品素材としてヨーグルトなどの乳製品やサプリメントの成分として配合され、市販されている。

我々はラクトースの酸化は酢酸菌のＰＱＱ依存性膜結合型のグルコースデヒドロゲナーゼにより触媒されることを報告している。本酵素のラクトースに対する酸化活性は、本来の基質である D-グルコースに対する酸化活性と比較すると、極めて微弱であった。しかし、酢酸菌の休止菌体によるラクトースの酸化反応は、高濃度ラクトース（30%）存在下でも、効率的に進むことから、高濃度の基質と反応させることで、反応速度を高め、効率的にラクトビオン酸を生産することができた。ただ、反応が進み、基質濃度が低くなった際の反応速度の低下が懸念された。しかし、実際にラクトース酸化反応の経時変化を調べると、ラクトビオン酸への変換が進み、ラクトース濃度が低くなっても、ラクトース酸化反応速度の明らかな低下は観察されなかった。そのため、我々は反応時に酢酸菌のラクトース酸化活性が誘導されると考え、基質濃度と酸化活性との関連について調べた。

（方法と結果）*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 を培養し、菌体を回収した。菌体を生理食塩水で洗浄した後、0、0.25、1、3% D-グルコース液に再懸濁し、27℃で振とう撹拌しながら、0、1、3 時間処理した。処理後、菌体を回収し、ラクトース酸化活性を測定したところ、1%以上の D-グルコース液で処理した菌体は、D-グルコースを加えなかった処理液と比較し、最大 3 倍の酸化活性の上昇がみられた。0 及び 5% D-グルコース液で 3 時間処理した休止菌体でラクトースを 24 時間酸化させ、生成するラクトビオン酸量を HPAEC-PAD で測定した。ラクトビオン酸生成量は 5%処理した休止菌体の方がより多かったことから、D-グルコース処理は、酸化活性だけでなく実際のラクトビオン酸生産量も増加させることが分かった。一方、D-グルコース処理と同様に 0、1、5%ラクトース液で休止菌体を処理し、ラクトース酸化活性を測定したが、活性の上昇は見られなかった。さらに、ラクトース濃度を 15%まで上昇させると、ラクトース酸化活性は 1.5 倍に上昇した。本結果は高濃度のラクトース処理は酢酸菌菌体の糖酸化活性を向上させることを示唆している。

acetic acid bacterium, glucose oxidase, lactobionic acid

発表責任者：桐生高明（kiryu@omtri.or.jp）

講演番号：2A10p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A10 会場

Pichia farinosa NBRC0462 株が産生するフルオロケトン還元酵素の遺伝子クローニングと諸性質検討

Gene cloning and characterization of fluoroketone reductase from *Pichia farinosa* NBRC0462

○釜井 彩花[1]、七田 沙耶香[2]、三木 慎介[3]、礒部 公安[1,2]、日比 慎[1]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子(株))
○Sayaka KAMAI[1], Sayaka SHICHIDA[2], Shinsuke MIKI[3], Kimiyasu ISOBE[1,2], Makoto HIBI[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Central Glass Co., Ltd)

［**背景**］光学活性な含フッ素アルコール類は、医薬品や農薬などの合成原料として有用であり、その簡便な合成方法の開発が望まれている。当研究室では、1,1,1-トリフルオロアセトン (TFAc) から (*R*)-立体選択的に 1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノール (TFIPL) を産生する微生物として *Pichia farinosa* NBRC0462 株を見出している。これまでに本菌株の保持する TFAc 還元酵素の特性解析を行った結果、本酵素は NADH 依存性の還元酵素であり、TFAc を始めとするフッ素を有するケトン化合物に対して高い活性を示したことから、フルオロケトン還元酵素 (FKR) と呼ぶ。本発表では FKR 全長遺伝子配列の決定と異種発現系による組換え FKR タンパク質の大量調製に関して、また FKR の酵素安定性、基質特異性、立体選択性などの酵素特性解析結果に関して報告する。

［**方法**］FKR のペプチド配列解析により得られた部分アミノ酸配列を基に、インバース PCR 等の手法により本酵素の遺伝子配列の全長を決定した。組み換え FKR を調製するため大腸菌による異種発現系を構築した。野生型 FKR 及び組み換え FKR は各種クロマトグラフィーにより精製した。酵素活性は TFAc を基質とし、340 nm における NADH の吸光度変化として測定した。酵素 1 U は 1 分間に 1 μmol の TFAc を還元する酵素量と定義した。還元反応生成物の光学純度は GC 分析及び、GC/MS 分析の結果から算出した。

［**結果**］FKR の推定アミノ酸配列解析の結果より、本酵素は短鎖型脱水素酵素還元酵素 (SDR) ファミリーに属する酵素であった。またゲノムデータベース解析において、FKR は *Pichia finlandica* 由来 (*R*)-2-octanol dehydrogenase (PfODH) と約 60%の相同性を示した。PfODH は Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}等の存在が安定性に関与することが報告されている [(1)]。これに対して我々は、野生型 FKR が Co^{2+}や Ni^{2+}の添加により熱安定性が大きく向上することを明らかにした。また組換え FKR においても熱安定性に対する Co^{2+}添加の向上効果を確認できた。次に野生型 FKR 及び組換え FKR を用いて還元反応生成物の光学純度を測定した結果、共に 95%以上の高光学純度で(*R*)-TFIPL を生成することを明らかにした。さらに野生型 FKR 及び組換え FKR の比較により見出された、両酵素間の酵素特性の差異に関しても報告する。

(1) H. Yamamoto, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97, 8087-8096 (2013)

Chiral fluoro alcohol, Carbonyl reductase, Thermostability

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A10p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A10 会場

無水糖を資化する好熱菌の生育特性

Characterization of thermophiles utilizing anhydro sugars

○岩崎 慎太郎[1]、吉田 信行[1]、平井 宏和[2]、濱口 徳寿[2]([1]静大院・総合科技、[2]日本食品化工（株））
○ Shintaro IWAZAKI[1], Nobuyuki YOSHIDA[1], Hirokazu HIRAI[2], Norihisa HAMAGUCHI[2]
([1]Shizuoka Univ., [2]Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)

【目的】

水溶性食物繊維素材の難消化性グルカン(RG)[1,2]やポリデキストロースには，原料由来のグルコースに加え，グルコースの 1 位と 6 位の水酸基が脱水縮合した 1,6-アンヒドロ-β-D-グルコピラノース(通称レボグルコサン， LG）という無水糖が含まれる．水溶性食物繊維の純度向上を目的に，効率的な高温条件下での LG 除去プロセスの開発を検討しており，これまでに高温（60℃）で LG を炭素源として生育可能な微生物を自然界からスクリーニングした結果， *Bacillus* 属，*Geobacillus* 属の 3 種の好熱菌を得ている[3]．今回はそれらの生育特性について報告する．

【方法・結果】

3 株の LG 資化性好熱菌の最適生育温度は 50～60℃であり，それぞれの最適温度で LG を唯一の炭素源とする最少培地（LG 培地）で培養すると，培地中の LG が時間と共に減少していることが確認できた．中でも 2701 株の生育が最もよく，72 時間で 0.1%の LG を完全に資化した．さらに，これらの好熱菌はグルコースも資化できるため，本菌のみでグルコースと LG の除去が可能となる．実際に，未精製難消化性グルカン標品(RG)を炭素源とする培地でこれらの株を培養したところ，高分子グルカン画分を減少させることなく，効率的に LG を除去できることが明らかとなった．2701 株は 16S rDNA 解析から *B. smithii* と同定されたが，この種の好熱菌は様々な炭素源を高温で資化できることからバイオマス利用に有用であることが知られている．単離菌 3 株と *B. smithii* のタイプカルチャーの炭水化物資化性試験を行ったところ，単離菌は無水糖を含む様々な炭水化物を資化できるが，タイプカルチャーは無水糖を資化することができなかった．炭水化物資化能については 65801 株が最も優れており，試験したほとんどの糖質を資化でき，無水糖については LG 以外にセロビオースが脱水縮合したセロビオサンも資化できることが分かった．LG は自然界に比較的多く存在する糖であり，未利用資源とも考えられるので，今回の結果は単離菌の新たな可能性を示すものである．その他，LG 資化に関与する酵素活性の測定も試みたので合わせて報告する．

1: *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 7-13 (2015)
2: 農芸化学会 2017 年度大会，日本食品化工，農芸化学技術賞
3: 農芸化学会 2017 年度大会，4A06a07

indigestible glucan, levoglucosan, thermophile

発表責任者：吉田信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A10p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A10 会場

Microbacterium foliorum NBRC103072 による環状リポデプシペプチド tolaasin 除去機構
Elimination profiles of cyclic lipodepsipeptide tolaasin by *Microbacterium foliorum* NBRC103072
○富田 駿[1]、須恵 雅之[2]、梶川 揚申[2]、五十君 靜信[2]、篠原 弘亮[3]、横田 健治[2] ([1]東農大院農化、[2]東農大応生科、[3]東農大農)
○ Shun TOMITA[1], Masayuki SUE[2], Akinobu KAJIKAWA[2], Shizunobu IGIMI[2], Hirosuke SHINOHARA[3], Kenji YOKOTA[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Agr., Tokyo Univ. Agr.)

【目的】 Tolaasin はキノコ腐敗病病原菌 *Pseudomonas tolaasii* が産生する環状リポデプシペプチドである。現在、キノコ類の細菌病害に対する登録農薬はなく、生物農薬の開発が期待されている。我々は健全なシイタケ子実体を試料として、生物検定による tolaasin 解毒活性を指標に、tolaasin 解毒細菌の分離を試みた。そして tolaasin 解毒活性を示す *Microbacterium* 属菌株を分離した。そこで本属の基準菌株を対象に、機器分析による培養液の tolaasin 除去活性を評価したところ、*M. foliorum* NBRC103072^T が最も高い tolaasin 除去活性を示した。本菌株を用いたキノコ腐敗病に対する生物農薬の開発において、その tolaasin 除去機構の解明は重要であると考える。そこで、本研究では本菌株の tolaasin 除去機構について報告する。
【Tolaasin 除去活性の局在】 本菌株の液体培養から菌体懸濁液と培養上清を調製し、各々、tolaasin 除去活性を評価した結果、菌体懸濁液にのみ除去活性が認められた。また、本菌株による誘導的な tolaasin 除去因子の分泌を確認するため、tolaasin 処理した培養液から上清を回収して評価し、tolaasin 除去因子は誘導的にも分泌されないことを確認した。以上の結果から、本菌株の tolaasin 除去において菌体の存在が必須であることを明らかにした。
【菌体懸濁液の tolaasin 分解特性】 Tolaasin 処理した菌体懸濁液の上清について LC-MS/MS 解析を行ったところ、727.42$[M+H]^+$と 640.39$[M+H]^+$の tolaasin の加水分解により生ずる 2 種類の部分構造に相当する質量が検出された。これら上清中の分解反応生成産物の生成量および tolaasin 減少量の経時的変化を精査した結果、菌体懸濁液へ添加した tolaasin は 5 分以内に急激に 30 %以下に減少する一方、反応生成産物は直線的に徐々に増加した。また、本菌株の tolaasin 除去活性に対する pH の影響を pH 4～9 の範囲で評価したところ、tolaasin 除去活性と分解産物の産生量の最大値は異なる pH で認められた。これらの結果は、本菌株の tolaasin 除去機構において、tolaasin は菌体への結合後に膜局在型の分解酵素により加水分解され、tolaasin 分解反応生成産物が菌体から上清へ移行することを示唆した。
【菌体の界面活性剤処理による tolaasin 分解因子の可溶化】本菌株の菌体を界面活性剤で処理し、その上清中の tolaasin 分解活性を評価したところ、分解活性が認められ、更に経時変化を精査したところ、tolaasin 減少速度と分解産物の生成速度は反比例した。また、界面活性剤処理した上清の tolaasin の加水分解における至適 pH は、tolaasin 減少量と分解産物生成量において何れも pH7 で最大となり、前項で示した、tolaasin の菌体への吸着と分解が別の機序により起こることを支持する結果となった。

Tolaasin, Cyclic lipodepsipeptide, *Microbacterium foliorum*

発表責任者：富田　駿（shun93free50011@gmail.com）

講演番号：2A10p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A10 会場

ミトコンドリア代謝の抑制による出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産能力の向上

Repression of mitochondrial metabolism for 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae*

○森田 啓介[1]、松田 史生[1]、岡本 浩二[2]、石井 純[3]、近藤 昭彦[3]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報、[2]阪大院・生命、[3]神戸大院・イノベ)
○Keisuke MORITA[1], Fumio MATSUDA[1], Koji OKAMOTO[2], Jun ISHII[3], Akihiko KONDO[3], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. FBS, Osaka Univ., [3]Grad. Sch. STI, Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞質ピルビン酸はミトコンドリアピルビン酸輸送体 (MPC) によってミトコンドリアに取り込まれて代謝されるが、マイトファジー必須因子 (Atg32p) 遺伝子の破壊株ではこのミトコンドリアの代謝が減少する可能性が示唆されている (Okamoto *et.al.*, 2009、Shiroma *et.al.*, 2014)。本研究では、ミトコンドリアでのピルビン酸代謝に関わる *MPC1* や *ATG32* 破壊株の代謝を解析し、得られた知見を 2,3 ブタンジオール (23BD) 生産株の育種へと応用した。
【方法】出芽酵母 BY4742 株、*MPC1* 欠損株および *ATG32* 欠損株に酢酸リチウム法でベクターを導入し、形質転換体を構築した。構築株は 5 mL の 20 g/L グルコース SD 培地で培養し、24 時間目の菌体からメタノール-クロロホルム-水法で抽出した代謝物中間体を LC-MS/MS で分析した。また、培養開始から 48 時間目の培溶液をガスクロマトグラフィーで測定し 23BD 発酵能を評価した。 [1-^{13}C]グルコースを用いた同位体追跡実験では対数増殖期中期の菌体を回収し、MTBSTFA で誘導体化したタンパク質由来アラニンの ^{13}C 濃縮度から解糖系とペントースリン酸経路のフラックス分岐比を推定した。
【結果】*S. cerevisiae* BY4742 株、*MPC1* 欠損株および *ATG32* 破壊株を培養した結果、増殖速度が野生株 (0.15±0.01 h^{-1}) に対して *MPC1* 欠損株と *ATG32* 破壊株では 0.24±0.01 h^{-1} と 0.25±0.01 h^{-1} 向上したが、3 株のグルコース取り込み速度に大きな差は見られなかった。同位体追跡実験の結果、*MPC1* 欠損株と *ATG32* 破壊株では解糖系で代謝されるグルコースの割合が 2%ほど向上していたが、増殖速度の向上に対する影響としては小さいと考えられる。そこで、各株から抽出した代謝物中間体のプール量を比較した結果、細胞内のピルビン酸プール量が *MPC1* 欠損株と野生株は同程度であるのに対し、*ATG32* 破壊株では 2.3 倍に向上していた。このことから、*MPC1* 欠損株ではミトコンドリアにピルビン酸が取り込まれず、一方で *ATG32* 破壊株ではミトコンドリアに取り込まれたピルビン酸が代謝されずに蓄積することで余剰の炭素が生じ、増殖向上に寄与しているのではないかと考えられる。この余剰ピルビン酸を 23BD 生産に転用するため、ピルビン酸から 23BD を生産する反応を触媒する 3 つの代謝酵素遺伝子の過剰発現株を構築した。発酵性試験の結果、23BD 生産能を付与した BY4742 株の 23BD 生産濃度は培養開始 48 時間後で 23.5±12.8 mg/L だったが、*MPC1* 欠損株と *ATG32* 欠損株では、それぞれ 14.3 倍と 23.6 倍に向上した (336.4±113.5 mg/L、557.0±20.6 mg/L)。さらに到達 OD は野生株 (4.2±0.1) に対してそれぞれ 3.3±0.3 と 2.6±0.4 に減少しており、増殖向上に寄与した余剰の炭素が 23BD 生産に転用されていることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, mitophagy, 2,3-butanediol

講演番号：2A10p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A10 会場

Leuconostoc mesenteroides が生産する不溶性グルカンとゼオライトを用いた凝集剤の調製

Production of flocculant from insoluble glucan of Leuconostoc mesenteroides and zeolite

○玉木 友理[1]、松村 杏菜[1]、川井 貴裕[1]、立木 隆[2]、矢野 成和[1] ([1]山形大院理工、[2]立命館大生命科学)
○ Yuri TAMAKI[1], Anna MATSUMURA[1], Takahiro KAWAI[1], Takashi TACHIKI[2], Shigekazu YANO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】廃水処理等で使用される凝集剤として、無機系や合成高分子系の化学凝集剤がある。以前より、自然環境への負荷が少ない生物由来の高分子凝集剤（バイオ凝集剤）の開発が期待されている。しかしながら、凝集効果と費用の面から課題が多い。本研究では、乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* がスクロースを炭素源として培養した際に、培養液中に α-1,6-グルコシド結合と α-1,3-グルコシド結合を含む粘質性の不溶性グルカンを生産することに着目した。さらに本研究では、土壌改良材や水質浄化剤として用いられる多孔質アルミノ珪酸塩のゼオライトと不溶性グルカンを組み合わせたバイオ凝集剤を調製することで、凝集効果の向上を目指した。
【方法】*L. mesenteroides* は、スクロース添加 MRS 培地で培養した。ゼオライトを組み合わせたバイオ凝集を調製する際は、*L. mesenteroides* を一晩培養した後に、ゼオライトを培養液へ投入することで調製した。凝集能の評価は、セルロースを浮遊物として添加したモデル廃水とカオリン懸濁液を用いて行った。カオリンの凝集試験は、懸濁液に凝集剤を添加後に 2 分間撹拌し、静置させて懸濁液中の沈降を観察することによって評価した。
【結果】*L. mesenteroides* の培養液にゼオライトを投入することで、ゼオライト表面に不溶性グルカンが被覆した。不溶性グルカンの被覆量は、スクロースの添加濃度を増やすことで増加した。不溶性グルカンを被覆したゼオライトをモデル廃水に投入して通気撹拌したところ、浮遊物として添加したセルロースが凝集して沈降した。不溶性グルカンを被覆したゼオライトを新規のバイオ凝集剤とし、カオリン凝集試験を行った。その結果、本バイオ凝集剤は、カオリン懸濁液中のカオリン粒子を凝集させ、沈降を速くさせた。以上の結果をもとに、バイオ凝集剤の機能を解析している。なお、本研究の一部は国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）の研究成果展開事業「マッチングプランナープログラム」の支援によって行われた。

Leuconostoc mesenteroides, insoluble glucan, flocculant

講演番号：2A10p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A10 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* のα-グルコシダーゼが清酒中のオリゴ糖生成に及ぼす影響
The effect of alpha-glucosidase of *Aspergillus oryzae* on the production of oligosaccharides in sake
○小林 泉美[1]、本田 千尋[1]、山田 真理子[1]、徳岡 昌文[2]、進藤 斉[2]、穂坂 賢[2]([1]東農大院・農、[2]東農大・応生)
○Izumi KOBAYASHI[1], Chihiro HONDA[1], Mariko YAMADA[1], Masafumi TOKUOKA[2], Hitoshi SHINDO[2], Masaru HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】清酒中の糖は不揮発性成分として最も多く含まれる。このうち重合度(Degree of polymerization:DP)2～18 のオリゴ糖は清酒中に 0.9～2.0%ほど含まれ、その構造や生成機構に興味がもたれている。これまでの研究から、清酒中のオリゴ糖は共通して非還元末端にα-1,3 結合もしくはα-1,6 結合をもつ構造と考えられており、デキストリンの切れ残りもしくは麹菌 *Aspergillus oryzae* の糖転移酵素の作用により生成すると予想されているが、詳細は明らかではない。本研究では、麹菌の糖転移活性をもつ α-グルコシダーゼ遺伝子、*agdA*、*agdB* の破壊がオリゴ糖生成に及ぼす影響を明らかにするため、遺伝子破壊株を用いた製麹及び小仕込みを行いオリゴ糖を分析した。
【方法・結果】NS4 ⊿*ligD* 株を宿主とした相同組換えによる形質転換を行い、サザンブロット解析で *agdA* 破壊株、*agdB* 破壊株の取得を確認した。米麹の α-グルコシダーゼ活性は、*agdA* 破壊株が対照株の半分、*agdB* 破壊株が 0.8 倍程度であった。酒母省略三段仕込みの製成酒は両破壊株で DP2 が対照株より増加、DP3 以降は減少する傾向がみられた。オリゴ糖の構造異性体を分離可能な条件で分析したところ、コージビオース、イソマルトースは全ての製成酒で検出され、マルトースは検出されなかった。イソマルトトリオ―スは *agdA* 破壊株の製成酒では検出されなかった。DP4～6 も対照株と遺伝子破壊株でクロマトグラムのピークパターンが異なることから、AgdA、AgdB がそれぞれオリゴ糖の生成に関与することが示された。現在、構造異性体の詳細な分析と *agdA*、*agdB* 二重遺伝子破壊株の取得を進めている。

oligosaccharide, α-glucosidase, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：2A10p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A10 会場

アミノ酸ラセミ化能を有するヒト腸内細菌の探索

Screening of gut microorganisms showing amino acid-racemizing activity

○森川 拓磨、岡田 奈津実、岸野 重信、小川 順（京大院農・応用生命）
○Takuma MORIKAWA, Natsumi OKADA, Shigenobu KISHINO, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

アミノ酸には L 体と D 体の光学異性体が存在するが、生物界は主に L-アミノ酸で構成されている。D-アミノ酸は天然には希少なアミノ酸であり、細菌のペプチドグリカンや微生物の産生する抗生物質等に含まれるにすぎないと考えられてきた。しかし近年、分析技術の発展により、ヒトを含む高等生物体内にも複数の遊離型 D-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。さらに遊離型 D-アミノ酸はさまざまな生理機能を有することも見いだされてきた。

そこで本研究では、プロバイオティクスとしての利用を考慮し、ヒト腸内細菌のなかでも特に乳酸菌を中心として、L-アミノ酸から D-アミノ酸へのラセミ化能を有する菌を探索した。

【方法・結果】

本研究室に保存されている乳酸菌や、ヒト腸内細菌を対象に、タンパク質を構成する主な L-アミノ酸をそれぞれ基質として、ラセミ化能を有する微生物のスクリーニングを行った。乳酸菌を微好気条件下 10 mL の MRS 培地で 24 時間、30℃、120 rpm で振とう培養（乳酸菌以外の菌は、嫌気条件下 15 mL の GAM 培地で 14 時間、37℃、120 rpm で振とう培養）した後、集菌・洗浄し、得られた洗浄菌体を 1 mL の 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。各種 L-アミノ酸を終濃度 0.2% (w/v) になるようにそれぞれ添加し、24 時間、30℃（乳酸菌以外の菌は 37℃）で嫌気条件下振とう反応を行った。反応終了後、GITC を用いて誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC） 分析により L 体から D 体への変換能を評価した。その結果、複数のアミノ酸に対しラセミ化能を有する乳酸菌を見いだした。また、反応時における PLP や NAD^+、$NADP^+$の有無、酸素の影響等によるラセミ化能の相違についても検討した。あわせて、一部の乳酸菌に見出されたラセミ化以外の反応についても報告する。

amino acid, racemization, lactic acid bacteria

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A10 会場

イタコン酸を変換する嫌気性菌の探索と代謝経路解析

Screening and metabolic analysis of anaerobic bacteria converting itaconic acid

松岡 智里[1]、○冨田 紳之佑[1]、竹内 道樹[2]、日比 慎[3]、高橋 里美[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]富山県大工・生工研セ)
Chisato MATUOKA[1], ○Shinnosuke TOMITA[1], Michiki TAKEUCHI[2], Makoto HIBI[3], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

イタコン酸(IA)は、発酵法による工業生産が実用化されており、種々の化合物へ変換しうる基幹化合物として注目されている。本研究では、嫌気性菌による IA 代謝に着目し、IA やその類縁物質を変換する嫌気性菌の探索を行い、その代謝経路の解析を行った。

【方法・結果】

スクリーニングの基質として IA とその異性体であるシトラコン酸(CA)などを用い、これら基質を変換する微生物の探索を行った。環境サンプルから単離した嫌気性菌あるいは研究室保存嫌気性菌をスクリーニング対象とした。スクリーニング用培地で培養後、休止菌体反応を行い、TLC および HPLC 分析により基質の減少と生成物の評価を行った。約 700 株の菌をスクリーニングした結果、11 株の菌が IA あるいは CA の資化性を示した。これらの資化性菌のうち、研究室保存菌の *Eubacterium nodatum* の代謝について詳細な解析を行った結果、本菌は IA と CA の異性化を触媒する活性を有することを明らかにした。また *E. nodatum* の IA、CA 代謝物の分析結果から、本菌は IA あるいは CA を水和しシトラマル酸を生成した後、ピルビン酸と酢酸にまで分解することが示唆された (図 1)。

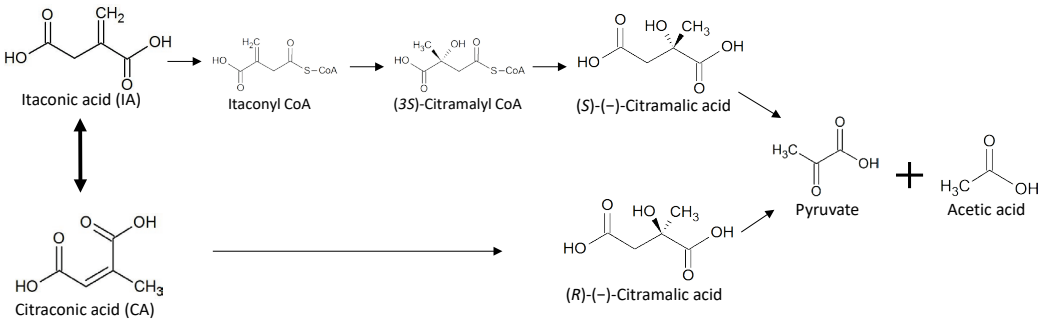


図 1　推定される *Eubacterium nodatum* のイタコン酸代謝経路

itaconic acid, Eubacterium nodatum, anaerobic bacteria

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A10 会場

タンデム酵素反応を利用した(+)-alliin 生産の為のバイオプロセス開発
Bioprocess development for (+)-alliin production by the tandem enzyme reaction
○飯星 貴幸[1]、日比 慎[2,3]、小園 祥子[1]、竹内 道樹[2]、高橋 里美[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]富山県大工・生工研セ)
○ Takayuki IIHOSHI[1], Makoto HIBI[2,3], Shoko KOZONO[1], MIchiki TAKEUCHI[2], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbial., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ.)

≪目的・背景≫

ネギ属であるニンニクに含まれる含硫アミノ酸の *S*-アリル-L-システインスルフォキシド((+)-alliin)には糖尿病や動脈硬化の予防効果が報告されている。現在の(+)-alliin の産業的な生産法としてはニンニクからの抽出が挙げられるが、その含有率の低さに起因する高い生産コストや低い純度が問題点となっている。そこで本研究では、微生物酵素を用いた新規なバイオプロセスによる(+)-alliin の生産法の構築を目的とした。

≪方法・結果≫

本研究室より単離された *Bacillus thuringiensis* 2e2 株由来の Isoleucine dioxygenase（IDO）は、(+)-alliin の前駆体である *S*-アリル-L-システインの立体選択的なスルフォキシド化を触媒する。本酵素と *Enterobater aerogenesis* 由来 Cysteine desulfhydrase（CD）を用い、安価な化合物からの(+)-alliin 生産プロセスを考案した（図１）。*S*-アリル-L-システインの合成反応は可逆的であり生産効率が低いが、不可逆な IDO 反応を共役することで、本バイオプロセス全体では(+)-alliin の合成側へと反応を進行させることが可能となる。

本バイオプロセスを用いた(+)-alliin 生産を検討する過程で、*S*-アリル-L-システインの合成反応を *Escherichia coli* が触媒し、CD 組み換え大腸菌よりも効率よく *S*-アリル-L-システインを供給していることを見出した。*E. coli* より *S*-アリル-L-システイン合成反応に関わる酵素を精製し、アミノ酸配列を解析した結果、本酵素は Tryptophanase（Try）であることを明らかにした。さらに、Try と IDO のタンデム酵素反応を用いた (+)-alliin 生産について検討を行った結果、基質としてアリルメルカプタン(375 mM)、ピルビン酸ナトリウム（200 mM)、硫酸アンモニウム（300 mM)、α-ケトグルタル酸（30 mM）を用いた条件で、7.45 mM の(+)-alliin の生産を達成した。

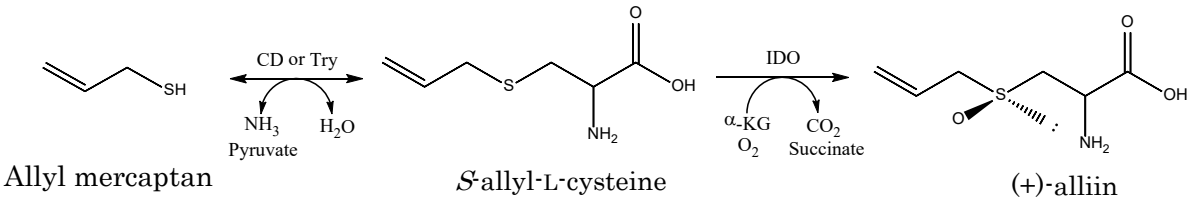


図 1

(+)-alliin, Tryptophanase, Isoleucine dioxygenase

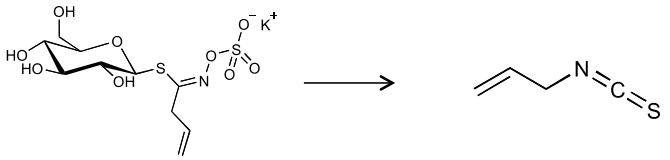
発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A10 会場

乳酸菌 *Lactobacillus farciminis* KB1089 株におけるシニグリン代謝に関わる酵素系の解析
Analysis of the enzyme system involved in sinigrin metabolism in *Lactobacillus farciminis* KB1089

○渡邊 寛子[1]、岸野 重信[1]、宇佐美 陸[1]、小佐田 健吾[1]、青木 雄大[2]、菅沼 大行[2]、青木 航[1]、小川 順[1] ([1]京大農、[2]カゴメ株式会社イノベーション本部)
○Hiroko WATANABE[1], Shigenobu KISHINO[1], Riku USAMI[1], Kengo OSADA[1], Yudai AOKI[2], Hiroyuki SUGANUMA[2], Wataru AOKI[1], Jun OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagome Co., Ltd.)

【目的】 ブロッコリーなどのアブラナ科植物に含まれるシニグリンは、これらの食品の辛味成分であり、*S*-グリコシド結合型配糖体（グルコシノレート）の一種である。食品由来のシニグリンはヒトに摂取されたのち、ヒト自身の消化は受けず、主に腸内細菌の作用により硫黄および窒素原子を含むアリルイソチオシアネート（AITC）へと変換される。AITC は、抗炎症・抗ガン・抗酸化作用などの生理機能を有する化合物である一方、シニグリンはこれらの生理機能を示さない。したがって、食品に由来する AITC の生理機能は、個人の腸内細菌叢の AITC 生成活性に左右される。このため、腸内細菌によるシニグリン代謝に注目が集まっているが、詳細な代謝機構は未だ解明されていない。そこで本研究では、乳酸菌におけるシニグリン代謝機構の解明を試みた。



シニグリン **AITC**

【方法・結果】 乳酸菌を対象として、培養中にシニグリン分解能を示す菌株を探索した。その結果、最も高いシニグリン分解活性を示したすぐき漬け由来の *Lactobacillus farciminis* KB1089 を選抜した。次に、本菌の洗浄菌体を用いた反応について解析したところ、シニグリンを AITC へと変換する活性は、培養中、グルコース枯渇後に培地中にシニグリンが存在することによって誘導されることが明らかになった。一方、無細胞抽出液を用いた反応では、活性を確認することができなかった。本活性に関わる酵素を特定するために、比較定量プロテオーム解析により誘導菌体と非誘導菌体における発現タンパク質の差異を評価した。特定されたタンパク質のうち、誘導菌体に特異的に発現する 2 種のタンパク質、PTS sugar transporter、aryl-phospho-β-D-glucosidase に着目し、多段階で進行するシニグリン代謝機構を予測した。両タンパク質のシニグリン代謝への関与を示すために、大腸菌を宿主とする異種タンパク質発現系を構築し、形質転換株におけるシニグリン分解活性を評価した。その結果、PTS sugar transporter、aryl-phospho-β-D-glucosidase の 2 遺伝子共発現株でシニグリン分解および AITC 産生を確認した。これにより、着目した 2 つのタンパク質がシニグリン代謝に関与することを明らかにした。

lactic acid bacteria, glucosinolate, allyl isothiocyanate

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A10 会場

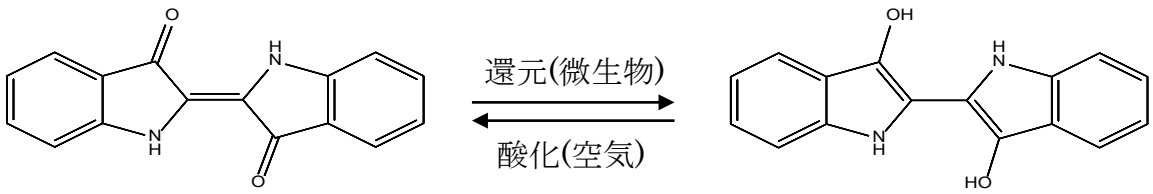
インジゴ還元菌におけるメディエーターの影響とその機能解析

The effects of mediators on indigo-reducing bacteria

○清藤 鈴奈[1]、竹内 道樹[2]、久郷 将見[1]、多田 真奈巳[3]、阪本 鷹行[3]、櫻谷 英治[3]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]徳大・生物資源)
○ Suzuna KIYOFUJI[1], Michiki TAKEUCHI[2], Masami KUGO[1], Manami TADA[3], Takaiku SAKAMOTO[3], Eiji SAKURADANI[3], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ.)

【背景・目的】

日本の伝統産業である藍染めは、タデアイ葉由来インジゴの微生物還元を利用して行われている。藍色成分である非水溶性色素のインジゴは、アルカリ条件下で微生物により水溶性のロイコインジゴへと還元され、布に吸着できるようになる。現在、インジゴ還元菌の単離に成功した報告[1)]はあるが、インジゴ還元能を定量的に評価した報告はない。そこで本研究では、インジゴ還元能の定量法を確立し、これを用いたインジゴ還元菌の探索を行った。さらに、インジゴの還元に関与する酵素の機能解析を目的とし、インジゴ還元反応における還元力供給系やメディエーターの検討を行った。



インジゴ　　ロイコインジゴ

【方法・結果】

藍染めの染色液や染料の素であるすくも、タデアイの乾燥葉などを菌の分離源とし、アルカリ・嫌気条件下で微生物の単離を行った。得られた微生物について、ふすまを含む培地での培養に伴う還元能や、休止菌体反応における還元能を評価した。評価方法としては、遠沈後の培養液上清に溶けているロイコインジゴを空気に晒すことでインジゴへと酸化させ、スペクトルを測定することでインジゴ還元能を定量的に評価した。それにより得られたインジゴ還元能の高い菌株について 16S rDNA 解析による菌の同定を行い、*Alkalibacterium* 属や *Clostridium* 属であることを明らかにした。さらに、これらの菌株を用いてインジゴ還元反応における還元力供給系やメディエーターの影響等の条件について検討を行い、アントラキノン存在下で、ロイコインジゴ量の増加が確認された。現在はアントラキノン類や他の有機物についてもメディエーター機能の検討を行っている。

1) Aino K. et al., FEMS Microbiol Ecol 74, 174–183. (2010)

indigo, indigo reduction, anaerobic bacteria

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A10p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A10 会場

ロドコッカス発現システムを用いたピリドキサミンの産生

Production of Pyridoxamine Using *Rhodococcus* Expression System

○山村 栄虎、藤本 昇（協和ファーマケミカル株式会社）
○Ei-Tora YAMAMURA, Noboru FUJIMOTO (Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

【背景・目的】ピリドキサミン(PM)はビタミン B_6 の貯蔵型と考えられている。生体内で活性型ビタミン B_6 に変換されると、アミノ酸代謝や神経伝達物質合成などの反応に用いられる。ヒトの生命にとって重要な化合物であることから、医薬品の開発[1)]や栄養補助食品に使用されている。

これまでにビタミンを産生する微生物について多くの文献[2)]があるが、PM については産業利用できるほど微生物で産生させた報告がない。そこで、物質産生能力が高いロドコッカス属細菌[3,4)]を用いて PM 産生システムの構築を目的に検討した。

【方法・結果】ピリドキシン(PN)を出発原料とし、pyridoxine 4-oxidase を用いてピリドキサール(PL)に変換し、pyridoxamine-pyruvate aminotransferase を用いて PL から PM に変換する反応で PM の産生を検討した。ロドコッカス発現システム[5)]で pyridoxine 4-oxidase 遺伝子を発現させ菌体反応したところ、大腸菌で発現させた場合よりも約 5 倍の PL が産生した。宿主の選抜と菌体反応条件を最適化したところ変換率が 5 倍以上向上し、500 mM(塩として約 10%)の PN から 400 mM(塩として約 8%)の PL を産生することができた。さらに、pyridoxamine-pyruvate aminotransferase 遺伝子を共発現させたところ約 70%の変換率で PM を得ることができた。

【考察】ロドコッカス発現システムを用いたところ *groELS* 遺伝子などを共発現させることなく、500 mM の PN から 400 mM の PL を産生することができた。また、大腸菌よりも産生量が多いことからロドコッカス属細菌は異種発現や酸化反応について適した宿主の一つであることが示唆された。さらに、約 70%の変換率で PM を得ることができたことから、ロドコッカス属細菌は、物質産生に有利な宿主であることが推察された。

【参照】1) 宮田敏男、特許第 5992086 号
2) Shinjoh, M., *Microbiol. Cult. Coll.*, 29, 91-96 (2013).
3) Urano, N., Fukui, S., Kumashiro, S., Ishige, T., Kita, S., Sakamoto, K., Kataoka, M., and Shimizu, S., *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 266-271 (2011).
4) Kimura, T., Ishikawa, C., Osorio-Lozada, A., Robins, K.T., Hibi, M., and Ogawa, J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 1772-1776 (2014).
5) 山村栄虎、藤本昇、2017 年度日本生物工学会、2P-G015、(2017)

Rhodococcus, pyridoxamine, gene expression

発表責任者：山村　栄虎（eitora.yamamura@kyowa-kirin.co.jp）

講演番号：2A10p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A10 会場

Flavin prenyltransferase 発現によるプロトカテク酸脱炭酸酵素の活性化
Enhancement of protocatechuate decarboxylation by a flavin prenyltransferase expression

○栗本 祐樹、尾形 拓哉、坂元 君年、園木 和典（弘前大院・農学生命）
○ Yuki KURIMOTO, Takuya OGATA, Kimitoshi SAKAMOTO, Tomonori SONOKI (Hirosaki Univ.)

【目的】プロトカテク酸（PCA）脱炭酸反応は、農薬・医薬品などの原料として利用できるカテコールや、樹脂・繊維の原料として利用できるムコン酸といった基幹化合物を、再生可能な植物バイオマスから生産するために必須の反応ステップである。しかし、この反応を触媒する PCA 脱炭酸酵素（AroY）の酵素活性が小さく、その解決方法が検討されてきた。我々はこれまでに、4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit B (KpdB) の発現が AroY 活性を 10 倍以上に向上させることを明らかにしてきたが [(1)]、KpdB の役割は未解明であった。本研究では AroY が KpdB の発現により活性化されるという特徴に注目し、KpdB の機能解明に取り組んだ。

【結果と考察】AroY（約 54 kDa）と KpdB（約 22 kDa）を含む粗酵素液中の AroY 活性は透析 (MWCO 3,500) により約 95%減少した。このことから、AroY はその活性に低分子量の因子（3,500 以下）を必要とすることが推測された。KpdB の推定アミノ酸配列は *Escherichia coli* 由来の Flavin prenyltransferase (UbiX) の推定アミノ酸配列と 49%の相同性を示し、UbiX はユビキノンの生合成に関わる 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate（3O4HB）脱炭酸酵素（UbiD）の補酵素として prenylated FMN (prFMN) を合成することが明らかにされた [(2)]。*UbiX* 遺伝子が破壊された *E. coli* JW2308 株では UbiD の基質である 3O4HB の蓄積が確認されたが、*ubiX* 遺伝子または *kpdB* 遺伝子の発現によって 3O4HB の蓄積が解消されたことから、KpdB は UbiX 同様 Flavin prenyltransferase として prFMN を合成することが示唆された。さらに、JW2308 株において *aroY* 遺伝子を発現しても AroY 活性は測定されなかったが、*ubiX* 遺伝子と共発現することで AroY 活性が得られたことから、AroY はその活性に UbiD 同様 prFMN を要求することが示された。また同株において、*kpdB* 遺伝子と *aroY* 遺伝子を共発現することによっても AroY 活性が得られたことから、KpdB は prFMN の合成を通して AroY を活性化することが明らかになった。

本研究の一部は科学研究費補助金、野田産研研究助成の支援を受けて実施した。

(1) Sonoki, T. et al., *J. Biotechnol.*, 192, 71-77 (2014).
(2) White, M. D. et al., *Nature*, 522, 502-506 (2015).

protocatechuate decarboxylase, flavin prenyltransferase

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2A10p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A10 会場

組換え大腸菌で生合成された色素を用いる光触媒的補酵素再生

Photocatalytic NAD(P)H regeneration using biosynthesized dye in recombinant *Escherichia coli*

○本田 裕樹、藤井 浩（奈良女子大・理・化学）
○Yuki HONDA, Hiroshi FUJII (Nara Women's Univ.)

【目的】シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるアルカンの水酸化のように反応の進行に NADH や NADPH 等の補酵素を必要とする酵素反応は、反応の有用性が認められながらも、反応の進行に必要な補酵素や還元力をどのように反応系に供給し続けかという課題が実用化を妨げており、簡便な補酵素再生系の構築が求められている。そこで本研究では、ヘムやクロロフィルの基本構造であり様々な生物の生体内に検出される生体化合物であるポルフィリン色素の分子光触媒としての機能に着目し、ポルフィリン色素を用いた光による補酵素再生反応の実現を目的とした。ポルフィリン誘導体やその金属錯体は分子光触媒として広く研究が進められており、ポルフィリン色素の生合成経路の強化によって微生物内で過剰に生合成されたポルフィリン色素も分子光触媒として機能させることが可能であると期待できる。本講演では、遺伝子導入による大腸菌での色素生合成能の強化と、生合成された色素を分子触媒とする NAD^+および $NADP^+$の光触媒的還元反応について報告する。

【方法および結果】光合成細菌由来の酵素遺伝子およびポルフィリン合成経路上の大腸菌由来の酵素遺伝子の 4 つの遺伝子を大腸菌 BL21(DE3)内で高発現させ、所定の方法で培養した。培養菌体および培養液が生合成された色素由来の赤色に呈色することを確認した。培養上清より当該色素を陰イオン交換樹脂を用いて抽出し、吸光スペクトルを測定したところ、ポルフィリン色素様のスペクトルが得られた。培養液から抽出した色素、NAD^+あるいは $NADP^+$、および電子供与体を KH_2PO_4-K_2HPO_4 緩衝液(pH 7)に溶解し、この溶液に対して 420 nm の LED 光を照射して経時的にスペクトル変化を観察したところ、光照射時間依存的な NADH あるいは NADPH に由来する 340 nm の吸光度の上昇が確認された。以上の結果、色素合成遺伝子群を導入した組換え大腸菌によって生合成されたポルフィリン色素が分子光触媒として機能し、光を用いた補酵素再生反応が可能であることが示唆された。現在、生合成されたポルフィリン色素の同定、その他の検証を進めている。

coenzyme, photocatalysis, porphyrin

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：2A10p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A10 会場

微生物由来酵素を用いたカテコール体セサミンの合成

Production of antioxidative sesamin-catechols by microbial enzyme

○周 碩、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院　生命環境）
○SHUO ZHOU, TAKUTO KUMANO, YOSHITERU HASHIMOTO, MICHIHIKO KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】

我々はゴマに含まれる抗酸化物質セサミンの微生物による代謝について研究を行い、セサミンのメチレンジオキシフェニル基を開裂するテトラヒドロ葉酸依存性の新規酵素 SesA を同定し報告した。SesA はセサミンをより抗酸化活性の高いカテコール体セサミンであるセサミンモノカテコール、セサミンジカテコールへと変換する。そこで本研究ではカテコール体セサミンの効率的な合成を目指して研究を行なった。

【方法・結果】

本研究ではまず、*sesA* 遺伝子発現ベクターで大腸菌を形質転換し、37°C で 2.5 時間培養後、IPTG を添加し 18°C で 16 時間培養を行なった。集菌した菌体を Tris-HCl (pH 8.0)に懸濁し、セサミンと混合して休止菌体反応を行った。反応後アセトン抽出、酢酸エチル抽出により反応産物を抽出し、HPLC により精製を行った。次に、同様に培養した組換え大腸菌から調製した無細胞抽出液や、精製した SesA を用いたカテコール体セサミンの生産についても検討を行い、反応産物の収率を比較した。

sesamin, antioxidant, bioconversion

講演番号：2A10p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A10 会場

産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* の GPI 型糖転移酵素 AgtA の生物学的機能解析

Biological functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycosyltransferase, AgtA in the industrial fungus *Aspergillus oryzae*

○小泉 亜未[1]、矢野 成和[2]、宮澤 拳[1]、吉見 啓[3]、佐野 元昭[4]、阿部 敬悦[1,3]（[1]東北大院農・生物産業創成、[2]山形大院理工、[3]東北大・NICHe、[4]金沢工大・ゲノム研）
○Ami KOIZUMI[1], Shigekazu YANO[2], Ken MIYAZAWA[1], Akira YOSHIMI[3], Motoaki SANO[4], Keietsu ABE[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Yamagata Univ., [3]NICHe, Tohoku Univ., [4]Kanazawa Inst. Tech.)

【背景・目的】
糸状菌の細胞壁は、α-1,3-グルカン（AG）や β-1,3-グルカン、キチンその他の多糖が複雑に入りくんだ強固な構造体である。特に細胞壁の最外層に存在する AG は糸状菌特有の細胞壁成分であり、感染宿主の防御応答からの回避因子や菌糸の接着因子として機能することが報告されている。しかし、AG の生合成機構およびその制御機構の詳細はいまだ明らかになっていない。そこで我々は、産業用糸状菌（麹菌）*Aspergillus oryzae* において、AG 構築に関わる遺伝子の一つと推定される *agtA*（*AoagtA*）に着目した。*AoagtA* は *A. oryzae* の AG 合成酵素遺伝子の一つである *agsB* とクラスターを形成しており、GPI アンカーを有する α-アミラーゼをコードすると推定される。*AoagtA* のオルソログである *Aspergillus nidulans* の *amyD* は、逆遺伝学的に AG の生合成に負の役割を担っていることが示唆されている。また、*Aspergillus niger* のオルソログ *AnagtA* がコードする AnAgtA は、酵素学的解析により糖転移酵素であることが報告された。しかし、AnAgtA がどのようなメカニズムで細胞壁 AG の生合成に関わっているかは不明である。本研究では、*A. oryzae* AoAgtA の酵素学的機能および生物学的機能を解析し、細胞壁 AG 生合成機構における AoAgtA の役割を明らかにすることを目的とした。
【材料・方法】
A. oryzae において、改変型 *enoA* プロモーター（P*enoA142*）を用いて *AoagtA* の高発現株を作製し、その培養性状を解析した。また、AoAgtA を酵素学的に解析するため、*Pichia pastoris* を用いた AoAgtA の発現系を構築した。*Pichia* 発現用 AoAgtA は GPI 結合サイト以降の C 末端側を取り除き、精製用 His-tag を融合して発現させた。本 AoAgtA を精製し、種々の多糖およびオリゴ糖を基質とした反応生成物を TLC および DIONEX 社製オリゴ糖分析装置で解析した。
【結果・考察】
液体振とう培養において *AoagtA* 高発現株は、AG 欠損株と類似した小さな菌糸ペレットを形成しながら生育した。このことから、*AoagtA* の高発現により細胞壁中の AG 量が減少したと推測された。現在、細胞壁構成糖の詳細な分析を進めている。また、精製 AoAgtA を用いた解析により、AoAgtA は可溶性デンプンに対して弱い分解活性を示した。マルトペンタオースを基質とした場合、糖鎖重合度が伸長した生成物が見られ、糖転移活性を有することが示唆された。現在、ニゲロースを含む種々のオリゴ糖に対する反応特性を解析しており、AG 合成機構への関与を考察中である。

Aspergillus oryzae, glycosyltransferase, GPI

講演番号：2A10p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A10 会場

Arthrobacter sp. K8 由来オルセリン酸脱炭酸酵素の特性解析と当該酵素を利用した有用芳香族ヒドロキシカルボン酸合成

Characterization of orsellinic acid decarboxylase from *Arthrobacter* sp. strain K8 and useful aromatic hydroxycarboxylic acid synthesis

○村瀬 諒太[1]、原 良太郎[2]、椛沢 遼[1]、広川 安孝[2]、木野 邦器[1,2]([1]早大・先進理工・応化、[2]早大・理工総研)

○Ryota Murase[1], Ryotaro Hara[2], Ryo Gawasawa[1], Yasutaka Hirokawa[2], Kuniki Kino[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景・目的】低炭素社会の実現に向け，バイオテクノロジーに寄せられる期待は大きい。大気中に含まれる炭酸ガスを回収し，有用物質に転換可能な技術が確立されれば革新的プロセスとなる。我々は，炭酸ガスの有効活用につながる可能性がある可逆的脱炭酸酵素[1)]に着目した。当該酵素は，炭酸（正確には重炭酸イオン）濃度の高い条件下ではカルボキシ化反応（炭酸固定）を触媒することを特徴とする。この酵素特性を有用物質生産へ応用すべく，多様な芳香族ヒドロキシカルボン酸を対象とし，脱炭酸酵素の探索を実施した。このうち，2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸（オルセリン酸）を単一炭素源とした土壌微生物のスクリーニングにより *Arthrobacter* sp. K8 を取得し，ショットガンクローニングと呈色法の併用によりオルセリン酸脱炭酸酵素遺伝子を同定した[2)]。本研究では，当該遺伝子の大腸菌における発現と酵素精製，ならびに最適反応条件の検討を実施した。この結果を踏まえ，飽和重炭酸イオン存在下での多様なフェノール類に対する炭酸固定を検討した。

【方法・結果】オルセリン酸脱炭酸酵素の発現用宿主に大腸菌 Rosetta2 (DE3)，ベクターに pET-28a(+)を用いた。培養時に IPTG により発現誘導を行い，回収した菌体を破砕し，Ni^{2+}カラムにより酵素を精製した。SDS-PAGE 分析の結果，大部分は不溶化していたが，一部は可溶化しており，ほぼ単一に精製できた。当該精製酵素を用いて脱炭酸反応における至適反応条件を検討したところ，45° C，pH 6.0 において最も高い活性を示した。続いて，反応における H_2O の関与を明らかにするため，脱炭酸反応における重水素取り込み試験を行った。H_2O の一部を D_2O に置換し，脱炭酸反応後の生成物の分子量を LC-MS で確認したところ，市販の標品よりも分子量が 1 だけ大きい数値が検出され，カルボキシ基が脱離した位置に重水素が取り込まれたことが示唆された。精製酵素を用いて基質特異性を検討した結果，オルセリン酸のみならず，4-メトキシサリチル酸，β-レゾルシン酸（2,4-ジヒドロキシ安息香酸）に対する可逆的脱炭酸活性も有していた。さらに，当該酵素発現大腸菌を触媒として用いた反応においても同様の化合物に対する可逆的脱炭酸活性を確認することができた。

1) M. Sato, *et al.*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **122**, 348-352(2015)
2) 原ら，日本生物工学会 2016 年度大会（2P-G052）

decarboxylase, carboxylation, orsellinic acid

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：2A10p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A10 会場

Lysobacter enzymogenes MK9-1 が生産するグルカナーゼとキチナーゼの特性評価
Characterization of glucanases and chitinases from Lysobacter enzymogenes MK9-1
○菅野 春樹[1]、高橋 譲[1]、若山 守[2]、今野 博行[1]、矢野 成和[1] ([1]山形大院理工、[2]立命館大生命科学)
○ Haruki KANNO[1], Yuzuru TAKAHASHI[1], Mamoru WAKAYAMA[2], Hiroyuki KONNO[1], Shigekazu YANO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】
新規の抗真菌活性を有する微生物の取得を目指し、米沢市の土壌からスクリーニングを行った。その結果、*Lysobacter enzymogenes* MK9-1 株を分離した。MK9-1 株はキチンを資化し、さらに接合菌 *Gongronella butleri* の生育を阻害した。このことより、*L. enzymogenes* は多様なグルカナーゼやキチナーゼを分泌生産している可能性が考えられる。
本研究では *L. enzymogenes* MK9-1 株が有する抗真菌活性に関わると予測される GH19 型キチナーゼである Chi19、GH64 型 β-1,3-グルカナーゼである Bglu64 と GH16 型 β-1,3-グルカナーゼである Bglu16 をクローニングし、大腸菌での発現を試みた。これら酵素の機能を解析し、抗真菌メカニズムの解明を目指す。
【方法と結果】
L. enzymogenes MK9-1 株の 16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、全ゲノム配列が同定されている *L. enzymogenes* M497-1 株と 99%の相同性を示した。*L. enzymogenes* M497-1 株の配列に基づいて、Chi19、Bglu64 と Bglu16 のプライマーを設計し、*L. enzymogenes* MK9-1 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、全ての遺伝子で増幅が確認できた。これらの DNA 断片を制限酵素処理し、発現ベクター pET-22b にライゲーションし、大腸菌を用いて発現を行った。
Chi19 のアミノ酸配列を解析した結果、*N*-末端からシグナル配列、機能未知配列、基質結合ドメインと触媒ドメインの 4 つの領域から構成されていた。各ドメインの性質を解析するために、シグナル配列を欠損させた Chi19ΔSig、シグナル配列と機能未知ドメインを欠失させた Chi19ΔNTerm、触媒ドメインのみからなる Chi19CAT の 3 種の変異酵素を作製した。3 種の無細胞抽出液のキチナーゼ活性を測定したところ、Chi19ΔNTerm が 4.8×10^{-2} U/mg を示したが Chi19ΔSig と Chi19CAT はほとんど活性を示さなかった。Chi19ΔNTerm については、イオン交換と疎水クロマトグラフィーを行うことで単一に精製し、性質を調べた。
Bglu64 と Bglu16 についても大腸菌で発現を確認した。無細胞抽出液の β-1,3-グルカナーゼ活性を測定したところ、Bglu64 は 2.0×10^{-4} U/mg、Bglu16 では 3.2 U/mg であった。Bglu16 については、高い活性を示したので、酵素の精製と性質の検討を行っている。
以上の結果をもとに、*L. enzymogenes* MK9-1 の抗真菌活性に寄与する酵素の解明を目指す。

glucanase, chitinase, Lysobacter enzymogenes

講演番号：2A11p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A11 会場

木材腐朽菌による加硫天然ゴムの分解

Biodegradation of vulcanized natural rubber by wood rotting fungi

○佐藤 伸 (公立鳥取環境大学)
○Shin Sato (Tottori University of Environmental Studies)

【背景】

自動車用タイヤの世界的な需要が増加している。昨年一年間に全世界では 1,595 万トンのタイヤが生産されて、その約 40 パーセントは中国によって消費されている。日本では昨年一年間にタイヤ本数 9,400 万本、重量では 99 万 7,000 トンの廃タイヤが発生している。国内で発生した廃タイヤは 91%がリサイクルされており、主に熱利用、原形加工用、海外輸出用となっている。中でも工場の燃料としての需要が高く、不足分は海外から切断品、破断品を有価購入する状況が続いている。

廃タイヤの 60%以上が燃料としてサーマルリサイクルされる一方、加工原料としてのリサイクルは全体の 16%にとどまる。加硫ゴムの加工原料化が進まない一つの原因は、加硫ゴム内部の複雑な化学結合によって、機械的な分解による質の高い材料を得ることが難しいためである。加硫ゴムのリサイクルには選択的な結合の切断が求められている。

加硫天然ゴムを分解する微生物がこれまでに見つかっている。そのうち、我々はこれまでの研究からきのこなどの木材腐朽菌が加硫ゴムを分解することを明らかにした。木材腐朽菌はもともと木材中のセルロースやリグニンを分解する能力をもつ一方、芳香族化合物の環境汚染物質や化学合成ポリマーの分解も報告されている。

これまで我々がゴム分解菌として報告したのは海外の菌株であり、国産の菌株の中でゴムの分解能は見つけられていなかった。生物を使った加硫ゴムのリサイクルプロセスを考えると、国内に生育する菌株を使うことが取り扱いの面で強く求められる。本研究では国産の加硫ゴム分解木材腐朽菌の探索を行い、その菌株の性質を解析した。

【結果】

鳥取県東部の森林で子実体を採取し、多胞子分離にて分離した木材腐朽菌による市販の加硫天然ゴムシートの分解を検討した。その結果、いくつかの白色腐朽菌で加硫ゴム分解が明らかとなった。培養 3 ヶ月間の菌処理によって、加硫ゴムシートの重量減少とシート表面の損傷が観察され、引張試験の結果から物性的な性質の劣化も確認された。鳥取で分離されたこれらの菌株の分解力は、我々がすでに報告した海外の菌株の分解力を凌ぐものであった。現在、鳥取で見つかった加硫ゴム分解菌株がどのようにゴムを分解するのか、その分解メカニズムの解明に向けた研究を行っている。

Biodegradaton, Vulcanized natural rubber, Wood rotting fungi

発表責任者：佐藤　伸（s-sato@kankyo-u.ac.jp）

講演番号：2A11p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A11 会場

環境汚染物質 1,4－ジオキサン分解菌の分類及び菌体膜脂肪酸の分析

The identification of environmental pollutant 1,4- dioxane-degrading bacteria and analysis of fatty acids composition in bacterial membrane

○佐藤 駿、倉根 隆一郎（中部大学）
○Takashi SATOH, Ryuichiro KURANE (Chubu Univ.)

<目的 >

1,4-ジオキサンは H21.11 に水質汚濁防止法の改定により、公共水域、地下水での基準値（0.05mg/l）と新たに制定された。また、国際がん研究機構によりクラス 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）カテゴリに分類されている。この物質は主に反応・抽出溶剤として利用され、AOP（オゾン+UV）処理が行われているが、処理コストは 260 円/m^3 と高く、また適用可能排水が限られている。平成 13 年度において 1,4-ジオキサンの排出量は総合 2564t であり、また、不法投棄による環境汚染が現在においても問題となっている。1,4－ジオキサンは標準の活性汚泥法において好気・嫌気性ともに分解性 0%とされていたが、近年において、1,4－ジオキサン含有汚泥から発見されており、分解可能物質とされている。そのため、本研究では、一般環境中に存在し、かつ、1,4-ジオキサンを安価で低環境負荷を目指し、現行の活性汚泥法による処理に組み込め、システム化のできる菌株の探索をした。また、得られた菌株の菌体膜を構成する脂肪酸を分析することで有機溶媒耐性菌の性質の一つである脂肪酸の炭素数及び不飽和脂肪酸の増加が見られるか調査した。

<方法>

当研究室で発見した分解能がある *Ochrobactrum* sp. 及び *Arthrobacter* sp.を 300ppm1,4－ジオキサン含有無機塩液体培地及び 300ppm1,4－ジオキサン含有 LB+酵母エキス液体培地にて培養し、時間毎に TOC 測定にて 1,4－ジオキサンの減少率を調べた。また、GC を用いて菌体膜の脂肪酸をメチルエステル化させ、分析した。

<結果>

1,4－ジオキサンの減少率及び菌体膜の脂肪酸の分析結果を報告する。

1,4-dioxane, bacteria, fatty acid

講演番号：2A11p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A11 会場

微生物によるテレフタル酸の分解および有用物質の生産

Terephthalate degradation and functional substance production by bacteria

○中島 鈴佳[1]、内堀 孝博[2]、金森 拓[3]、中島 敏明[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]パナック工業、[3]筑波大)

○ Suzuka NAKAJIMA[1], Takahiro UCHIBORI[2], Taku KANAMORI[3], Toshiaki NAKAJIMA[1] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Panac Ind. Inc., [3]Univ. Tsukuba)

PET 製品のリサイクル等においては、モノマーを含む廃液が生じる場合が多い。その主成分はテレフタル酸とエチレングリコールであるが、活性汚泥による廃液処理においてテレフタル酸が残存し問題となっている。テレフタル酸は市場価値が安く、精製及び再利用は採算が合わないため現在はコストをかけて焼却処分されている。一方繊維業界においては、繊維の柔軟性や風合いの向上のためにポリエステル繊維のアルカリ分解(アルカリ減量処理)が行われており、多量のテレフタル酸が排出されている。

このように、PET 製品が多く利用されている社会において、処分されるテレフタル酸量もまた膨大なものである。そのためこれを単に分解するのではなく、有用物質に転換することができれば環境汚染の軽減と付加価値の産出の二重のメリットが生まれる。

テレフタル酸の微生物分解に関しては古くから知られているが、1%を超えるような高濃度のテレフタル酸の分解についての報告はほとんどない。これはテレフタル酸が水溶液中ではテレフタル酸塩として存在しており、塩濃度が高いこと、分解に際し発生するカウンターイオンの影響で溶液の pH がアルカリ性となることが原因と推測される。

我々はこれまでの研究で PET フィルム再生処理プラントの活性汚泥からテレフタル酸分解菌 *Pseudomonas* sp. TB-97 株を単離することに成功した。この株はテレフタル酸塩を高効率に分解可能であり、3 日で 20 g/L のテレフタル酸を完全分解し、4 日で 40 g/L のテレフタル酸を 70%分解することができる。本株は通性好アルカリ菌かつ中等度好塩菌であり、この性質が高濃度のテレフタル酸の分解に適していると考えられる。

代謝改変による有用中間体の生産を目的として TB-97 株の代謝経路の解明を行ったところ、本菌はテレフタル酸の初発酸化酵素であるテレフタル酸 1,2-ジオキシゲナーゼおよびこれにより転換されるプロトカテク酸を酸化する酵素、プロトカテク酸 3,4-ジオキシゲナーゼを有していることがわかった。しかしプロトカテク酸 4, 5–ジオキシゲナーゼは有していなかった。

プロトカテク酸は没食子酸やカテコールなどの原料となる。そこで本研究はプロトカテク酸 3,4-ジオキシゲナーゼを標的とした代謝改変によるプロトカテク酸生産株の取得を目的とする。現在、紫外線による突然変異誘発あるいは接合伝達による遺伝子組換えを行い、上記酵素遺伝子の破壊株の取得を試みている。

terephthalate, protocatechuate, Pseudomonas

講演番号：2A11p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A11 会場

活性汚泥中の微生物叢の解析

Analysis of microflora in activated sludge

○牧野 陽介、池田 衣里、川口 悟史、角野 立夫、三浦 健（東洋大学 応用生物科学）
○Yosuke MAKINO, Eri IKEDA, Satoshi KAWAGUCHI, Tatsuo SUMINO, Takeshi MIURA (Toyo Univ.)

【背景・目的】

現在、水処理において活性汚泥法は、最も一般的な技術である。その一方で、多量の汚泥廃棄物が問題視されている。日本においては産業廃棄物の 42.7%は余剰汚泥であり、再利用されているのは 7%にすぎない。さらに、処分工程には脱水、焼却処分、運搬と多大なエネルギーが要されている。そこで、活性汚泥を生物資源と考え、そこに存在する有用菌株を単離し、それらが産生する酵素の検出を目的とした。

【結果・考察】

初期の活性汚泥①と安定化した活性汚泥②中に、α-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼなど 12 種類、活性汚泥②のみ見られた活性はα-フコシダーゼなど 5 種類が検出できた。この結果より、活性汚泥②の方が生物活性が高く、汚泥中に生物が存在し酵素を産生していることが示唆された。そこで、様々な条件下で生菌数を測定した結果、最も多かったのが、活性汚泥①では 25℃、pH4、×1/2 NB、1%NaCl において 1.71×10^{8} cells/ml、活性汚泥②では 25℃、pH4、×1/10 NB、1%NaCl および 0%NaCl において 2.79×10^{8} cells/ml であった。一方、最も少なかったのが、活性汚泥①では 30℃、pH7、NB、1%NaCl において 2×10^{6} cells/ml、活性汚泥②では 30℃、pH10、×1/2 NB、0% NaCl において 4.9×10^{7} cells/ml であった。2 つの汚泥を比較すると、全条件下で活性汚泥②の方が生菌数が高く、アピザイムによる生物活性が高かったことからも妥当であった。また、単離株数は活性汚泥①から 363 株、活性汚泥②から 374 株であり、大きな差は見られなかった。単離株 737 株中、α-グルコシダーゼ産生株は 78 株、β-D-グルコシダーゼは 50 株、β-D-グルクロニダーゼは 2 株、β-D-フコシダーゼは 5 株、α-L-フコシダーゼは 2 株、β-D-グルコサミニダーゼは 77 株、β-D-キシロシダーゼは 7 株が見出された。

以上の結果から、活性汚泥由来微生物の産生酵素によりデンプンやセルロースをグルコース、キシランをキシロースに変換することが可能であり、バイオエタノール製造など工業的に活用できる可能性が示唆された。現在、単離株について MALDI-TOF MS を用いて解析している。

activated sludge, screening, useful enzyme

講演番号：2A11p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A11 会場

球磨焼酎粕を利用した光合成細菌の培養とその農業利用

Cultivation of purple nonsulfur photosynthetic bacteria with the medium made from distillation residue of Kuma Shochu and its application in agriculture

○宮坂 均[1,4]、古賀 碧[1,2]、岩本 康成[1]、平川 夕貴[1]、馬場 育美[1]、中原 達雄[3]、島谷 俊毅[3]、藤原 和利[3]、松浦 ゆかり[4]、内田 英雄[4]、山口 孚[4]、後藤 みどり[2]、森瀬 太一[2,4]、鈴木 良平[5]、林 修平[1]、山本 進二郎[1]（[1]崇城大応用生命、[2]崇城大学 Ciamo、[3]丸善製薬、[4]次世代のためにがんばろ会、[5]日立建機）

○Hitoshi MIYASAKA[1,4], Aoi Koga[1,2], Yasunari Iwamoto[1], Yuki Hirakawa[1], Ikumi Baba[1], Tatsuo Nakahara[3], Toshiki Shimatani[3], Kazutoshi Fujiwara[3], Yukari Matsuura[4], Hideo Uchida[4], Makoto Yamaguchi[4], Midori Goto[2], Taichi Morise[2,4], Ryohei Suzuki[5], Shuhei Hayashi[1], Shinjiro Yamamoto[1] ([1]Sojo Univ., [2]Sojo Univ. Ciamo, [3]Maruzen Pharmaceuticals Co., [4]Jisedainotameniganbarokai, [5]Hitachi Construction Machinery Co.)

（背景と目的）熊本県名産の球磨焼酎の焼酎粕（蒸留残渣）は年間約 26,000 トン排出され、全てリサイクル利用されているが、主な用途は肥料や家畜飼料で、より付加価値を高めた利用法の開発が望まれている。一方、光合成細菌（紅色非硫黄細菌）は様々な作物で成長促進・品質向上効果が確認されているものの、市販の菌が非常に高価（10L が数千円程度）なために農業者の間で普及が進んでいない。そこで、焼酎粕を培地として光合成細菌を培養できれば、焼酎粕の付加価値を高め、同時により安価な光合成細菌を農業者に提供することが可能となる。本研究では、球磨焼酎粕を単独の培地としてよく増殖する光合成細菌株の探索を行った。また焼酎粕で培養した光合成細菌を植物に施用した時の効果についても検討した。

（方法と結果）10 倍程度に希釈し pH を 6.8 に調整した球磨焼酎粕を培地として、日本各地の土壌、河川、池、等から分離した光合成細菌株 27 株（未純化株）の培養を試みた。その結果、明嫌気条件・明好気条件のいずれの条件でもよく増殖する光合成細菌株 4 株を分離することができた。暗条件では検討した全ての菌株で増殖は見られなかった。菌株の同定は、光合成細菌の光化学系 puf オペロンの *pufL*、*pufM* 遺伝子領域をターゲットとする独自にデザインした PCR プライマーを用いて、約 0.8kb の領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定して行った。分離した 4 菌株は、いずれも *Rhodopseudomonas palustris* または *Rhodopseudomonas faecalis* に最も近縁であった。

焼酎粕で培養した光合成細菌の植物への投与実験は、サツマイモ（品種：安納および金時）、ダイコン、ミニトマト、コウライシバで行った。菌株は熊本県八代市のレンコン畑土壌から分離した *Rhodopseudomonas sp.* YKBussan01 株を用い、菌の投与は培養した菌液を 500 倍から 5000 倍に水道水で希釈して週に 1 回葉面散布で行った（500 倍希釈：約 10^7 cfu/ml、5000 倍希釈：約 10^6 cfu/ml）。サツマイモ、ダイコン、トマトは収穫重量、コウライシバは被覆面積の増加を光合成細菌無投与対照区と比較して効果を評価した。またサツマイモとトマトについては糖度測定も行った。統計処理は 2 群間の比較は Student's t-test、多重比較は One-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test で行った。サツマイモ、ダイコン、トマトでは収穫重量において光合成細菌投与区で最大 1.3 倍程度の増加が見られた。コウライシバでも光合成細菌投与区で被覆面積が対照区に比べて約 1.3 倍増大した。サツマイモの糖度測定では、安納および金時の両品種で糖度の有意な増加が認められた（$P<0.05$）。

purple nonsulfur photosynthetic bacteria, distillation residue, Kuma Shochu

発表責任者：宮坂均（miyasaka@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：2A11p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A11 会場

特定外来生物ナガエツルノゲイトウおよびウスゲオオバナミズキンバイの好気性高温堆肥発酵処理に関わる微生物叢の解析
Analyses of microbial structure in aerobic, high-temperature composting process of *Alternanthera philoxeroides* and *Ludwigia grandiflora* subsp. *hexapetala*
○吉井 貴宏、杉原 孝文、古井 義博、矢野 紘子、森屋 利幸、志村 有通、大島 泰郎（共和化工・環境微生物研）
○Takahiro Yoshii, Takafumi Sugihara, Yoshihiro Furui, Hiroko Yano, Toshiyuki Moriya, Arimichi Shimura, Tairo Oshima (Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd)

【目的】近年、琵琶湖湖岸において生息域を拡大している水草のナガエツルノゲイトウ（*Alternanthera philoxeroides*）およびウスゲオオバナミズキンバイ（*Ludwigia grandiflora* subsp. *hexapetala*）は在来種に悪影響を及ぼす特定外来生物に指定されており、水揚げによる駆除や焼却処理がなされている。これら水草は駆除工程で発生した破砕片からも再生するなど生命力や乾燥耐性が高く、従来の堆肥化法では十分に死滅しないため、肥料として利活用できない。そこで我々は特定外来生物の安全かつ安定した堆肥化処理・肥料生産を目的として、発酵温度が 90℃以上に達する好気性高温堆肥発酵法による特定外来生物の堆肥化処理を試み、発酵に関与する微生物叢の解析を行った。
【方法】約 2.5 トンの水揚げされた特定外来生物の水草とその 2 倍量の微生物資材（戻し堆肥）をホイールローダーにより混合して、3 方がコンクリート壁で囲まれた発酵槽に堆積し、床下から通気を行うことで堆肥発酵を開始した。1 週間おきに堆肥の断面を作成し、床下から上に向かって 50 cm おきに試料を採取後に堆肥全体を混合した。温度は堆肥の中心を含む計 10 箇所で熱電対により計測した。試料の水分、強熱減量、pH、電気伝導度および 16S rRNA 遺伝子 PCR-DGGE を実施した。特定外来生物の死滅は *A. philoxeroides* または *L. grandiflora* subsp. *hexapetala* に特異的な PCR プライマー（Alt-F1: CCCGCRAACTTGTTAAATATT, Alt-R1: CGGATGCACGRCTATGTA または Lud-F1: CAATAATCAATACTCTTAATCTA, Lud-R1: GATTCAATTCATATATTTCG）を新たに設計し、PCR 法による DNA 解析を実施すると同時に、ポット栽培による生育試験により評価した。
【結果および考察】発酵温度は堆肥の中心付近が最も高く、発酵開始後 5 日で 75℃を超え、15 日後には 90℃に達した。45 日間の発酵期間のうち、計測した 10 箇所で 70℃以上が少なくとも 3 日以上維持されていた。堆肥表面から試料を採取したところ、発酵初期では特定外来生物の生育と DNA が確認されたが、混合 3 回目以降（27 日目以降）ではいずれも確認されなかったことから、特定外来生物がほぼ死滅したと考えられた。16S rRNA 遺伝子 PCR-DGGE の結果、堆肥表面や通気管の直上では *Planifilum* 属、*Saccharomonospora* 属および *Melghirimyces* 属細菌が主要な構成員として検出されたが、堆肥の中心付近では、はっきりとしたバンドが検出されなかった。したがって、超高温環境である中心付近は微生物が少なく、その周囲で活発な有機物分解が行われていると予想された。
【謝辞】本研究は滋賀県の平成 29 年度水草等対策技術開発支援事業の補助金助成を受けた。

compost, *Alternanthera philoxeroides*, *Ludwigia grandiflora* subsp. *hexapetala*

発表責任者：吉井　貴宏（takahiro.yoshii@kyowa-kako.co.jp）

講演番号：2A11p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A11 会場

沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）の付着微生物の菌叢解析とマンガン酸化物の生成
Mn-oxidation by epiphytic bacteria flora in a submerged plant *Egeria densa*

○原田 英美子、吉崎 翔平、市川 義崇、辻 康介、田辺（細井） 祥子 (滋賀県大環境科学)
○ Emiko HARADA, Shohei YOSHIZAKI, Yoshitaka ICHIKAWA, Kousuke TSUJI, Shoko Hosoi-Tanabe (The Univ. of Shiga Pref.)

【緒言】重金属集積性の水生植物は、水圏の環境浄化（ファイトレメディエーション）や有用金属の回収（ファイトマイニング）に利用できる可能性がある。琵琶湖水圏の集落環濠で採集した水生植物オオカナダモ（*Egeria densa*）からは高濃度のマンガン（Mn）が検出された。オオカナダモへの Mn 集積には、Mn 酸化作用を持つ付着微生物によるバイオフィルムの生成が関与している可能性がある。この反応が植物―微生物相互作用によるものかどうかを明らかにするため、本研究では無生物材料表面での酸化 Mn の産生を調査した。さらに、表面にバイオフィルムが観察されるオオカナダモの個体と観察されない個体を使用し、次世代シークエンサーによる付着微生物の菌叢の比較を行った。
【材料及び方法】無生物材料としてスライドグラス、合成高分子ゲル、天然高分子ゲル、濾紙をネットに入れて集落環濠水内に設置した。約 1 か月後に回収し、ロイコベルベリンブルー（LBB）による呈色反応により酸化マンガンの検出を行うとともに、ICP-OES を用いて鉄(Fe)および Mn の濃度を測定した。また、集落環濠より、バイオフィルムの付着が明らかに観察されるオオカナダモ個体を採集し、ゲノム DNA を抽出した。2-step tailed PCR を用いてライブラリを作成し、Miseq を用いてシークエンシングを行った。作成した OUT 配列を BLAST 検索し、系統推定を行った。バイオフィルムの付着が見られない個体でも同様の分析を行い比較した。
【結果】環濠内に設置した無生物材料のうち天然高分子ゲルは処理中に分解され、回収できなかった。LBB を添加したところ、回収できたすべての材料において酸化型 Mn の付着が確認された。無生物材料に付着した Mn の定量分析を行った結果、無生物材料の Mn 付着量は 1000～2000 ppm 程度であり、オオカナダモと比較すると非常に少ない値を示した。また、無生物材料における Mn の蓄積量は、Fe の蓄積量を大きく下回った。これに対してオオカナダモにおける Mn の蓄積量は常に Fe を上回っていた。無生物材料の表面でも Mn 酸化反応は起こっているが、オオカナダモ表面での反応の機構とは差異がみられることが明らかになった。また、微生物の菌叢解析の結果、プロテオバクテリア類の割合が、バイオフィルムを有するオオカナダモで多いことが判明した。オオカナダモから単離された 12 微生物株のうち、10 株がプロテオバクテリア類に含まれている。また、ベータプロテオバクテリアの一種である *Acidovorax* 属と判別された株で特に酸化 Mn 生成能が高いことが示されている。本発表では、*Acidovorax* 属単離株の特徴付けについても併せて報告する。

Egeria densa, manganese-oxidizing bacteria, bacteria flora

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：2A11p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A11 会場

セキショウ（*Acorus gramineus*）の根圏から単離した細菌による銀および金ナノ粒子の合成
Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by bacteria isolated from the rhizosphere of Japanese sweet flag (*Acorus gramineus*)

○黒田 真史[1]、南川 泰輝[1]、キム ミンス[2]、井上 大介[1]、惣田 訓[3]、西川 宏[2]、池 道彦[1]([1]阪大院工、[2]阪大接合研、[3]立命館大理工)
○Masashi KURODA[1], Taiki MINAMIKAWA[1], Min-Su KIM[2], Daisuke INOUE[1], Satoshi SODA[3], Hiroshi NISHIKAWA[2], Michihiko IKE[1] ([1]Osaka Univ., [2]JWRI, Osaka Univ., [3]Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】貴金属ナノ粒子は、比表面積が大きいためにバルク材料とは異なる光学的・電気的・磁気的特性を示す機能性材料であり、導電性接着剤、イメージング、触媒など、多様な先端技術への応用に向けた研究が行われている。一般的には貴金属ナノ粒子は化学合成により製造されているが、微生物による合成が実用化できれば、製造時の環境負荷やコストの低減が期待できる。そこで本研究では、銀および金のナノ粒子の合成が可能な細菌を取得し、そのナノ粒子合成特性の解析を行った。
【方法】金属精錬工場排水の浄化施設に植栽されていたセキショウ（*Acorus gramineus*）の根圏から、R2A 培地上にそれぞれ形態の異なるコロニーを形成する細菌を 10 株（AGR01～AGR10 株）単離し、16S rRNA 遺伝子配列を決定することで同定した。各菌株をそれぞれ LB 培地 50 mL を用いて 28℃で好気的に定常期まで培養した培養液から、遠心分離と孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターにより菌体を除去し、上清を回収した。上清 10 mL と 1 mM の $AgNO_3$ または $Na(AuCl_4)・2H_2O$ 10 mL を混合し、37℃または 60℃で静置することで反応させた。24 時間後、分光光度計を用いて 300-700 nm の波長における吸光度スペクトルを測定し、銀及び金ナノ粒子の合成を評価した。また、金ナノ粒子については、電界放出形透過電子顕微鏡（FE-TEM）により粒子形状と粒径を観察した。
【結果】銀ナノ粒子の合成について、供試した 10 株の細菌のうち AGR02 株および AGR10 株を用いた場合、37℃および 60℃のいずれの反応温度においても、銀ナノ粒子特有の波長 420 nm における吸光度ピークが検出された。一方、他の 8 株については明確なピークを示さなかった。金ナノ粒子の合成に関しては、AGR02 株については反応温度 37℃において、AGR03 株を除くその他 8 株については反応温度 60℃において、波長 500-650 nm の範囲になだらかな吸光度ピークを示した。上記試験において最も優れた銀・金ナノ粒子合成能力を示した AGR02 株と AGR10 株は、16S rRNA 遺伝子配列から、いずれも *Microbacterium maritypicum* であると同定された。反応温度 37℃において AGR02 株によって合成された金ナノ粒子、および反応温度 60℃において AGR10 株によって合成された金ナノ粒子について FE-TEM 解析を行ったところ、表面に凹凸を持った粒子が観察され、その平均粒径はそれぞれ 101 nm、56 nm であった。以上より、本研究で単離した細菌のうち、特に *M. maritypicum* AGR02 株および AGR10 株は、有望な銀・金ナノ粒子合成細菌であることが示唆された。
【謝辞】本研究は、大阪大学接合科学研究所「接合科学共同利用・共同研究拠点」共同研究員制度を利用して行った。

nanoparticle, precious metal, biosynthesis

発表責任者：黒田真史（kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A11p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A11 会場

金属を高蓄積する大腸菌の育種

Development of the Recombinant Escherichia coli Accumulating Molybdate.

○小島 文歌[1]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大院・理工、[2]マイクロナノテクセンター)
○FUMIKA KOJIMA[1], KANEYOSHI YAMAMOTO[1,2] ([1]Hosei Univ., [2]Res. Cen. for Micro-nano Tech., Univ. of Hosei)

細胞において金属は、多くの酵素の補因子として機能することや、タンパク質構造形成に関与するなど、重要な役割を持っている。一方で、高濃度の金属に晒された細胞は、金属の高い反応性により非特異的反応が生じ、様々な生理機能の阻害が起こる。そのため、細胞自体が直接金属ストレスに晒される細菌においては、細胞内金属濃度が厳密に制御されている。大腸菌 K-12 株は、金属に特異的な 14 種類の能動的取り込みシステムと 10 種類の能動的排出システムを持ち、それらの機能により細胞内金属ホメオスタシスを維持している。これら金属輸送システムは遺伝子発現レベルでの制御が行われており、金属結合転写因子が細胞内の金属に特異的に結合することで、標的遺伝子上流への結合能が活性化し、輸送システムタンパク質の発現が制御される。本研究では、特異的排出システムを待たず、1 種類の取り込みシステムのみを持つ微小金属モリブデンに対する大腸菌ホメオスタシスに注目し、細胞内でモリブデンを高蓄積する大腸菌の創出を試みた。

大腸菌グロバールレギュレーターである ModE は、モリブデン酸特異的取り込みシステム遺伝子 *modABCF* の発現を制御しており、細胞内へのモリブデンの取り込みを抑制し、細胞内でのモリブデン代謝酵素及び特異的結合タンパク質の細胞内量を増加させる機能を持つ。この *modABCF* を恒常的に発現するような *modABCF* 遺伝子発現プラスミドを作製した。このプラスミドを導入した形質転換体では、モリブデン酸への感受性が増加し、さらにモリブデンを補因子とする硝酸還元酵素活性が上昇した。つぎに、細胞内で ModE を増産させるため、強制的発現プロモーターと連結させた *modE* 遺伝子発現プラスミドを作製した。*modABCF* 遺伝子発現プラスミドを保持した形質転換体のモリブデン酸への高感受性は、*modE* 遺伝子発現プラスミドで回復した。これら 2 種類のプラスミドを導入させた形質転換体の細胞内モリブデン量を測定した結果、非組み換え大腸菌に比べてモリブデンを細胞内に含有していることが示された。この技術理論を応用することで、他種の金属を高蓄積する大腸菌の育種が可能であると考えられる。

Escherichia coli, Bioaccumulation, Molybdenum

発表責任者：山本兼由（kanyamam@hosei.ac.jp）

講演番号：2A11p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A11 会場

Shewanella 属内における金属腐食細菌の分布と腐食能
Iron dissolution and phylogenetic distribution of iron-corroding bacteria in the genus *Shewanella*.
○土屋 伸晃[1]、飯野 隆夫[2]、伊藤 公夫[3]、大熊 盛也[2]、高品 知典[1]、伊藤 隆[2]（[1]東洋大生命、[2]理研 BRC-JCM、[3]新日鐵住金）
○Nobuaki TSUCHIYA[1], Takao IINO[2], Kimio ITO[3], Moriya OHKUMA[2], Tomonori TAKASHINA[1], Takashi ITOH[2] ([1]Toyo Univ., [2]RIKEN-BRC JCM, [3]Nippon Steel and Sumitomo Metal Corp.)

【目的】金属腐食とは、金属と周囲の物質との反応によって、金属の溶解や腐食生成物(錆など)が生じる現象である。原油貯蔵タンクや水溶性ガス田など様々な施設・設備で金属材料は使用されており、金属腐食による劣化や損壊が大きな問題となっている。金属腐食は化学的要因だけでなく、微生物作用により生じることも明らかになっており、この現象は微生物腐食（MIC：Microbially influenced Corrosion）と呼ばれている。MIC の主な原因微生物は硫酸塩還元菌やメタン菌と考えられていたが、近年、硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 株が MIC を引き起こすことが Iino ら(2015, *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1839)により報告された。本研究では硝酸塩還元菌として知られ、主に海洋などの水圏に広く生息する *Shewanella* 属細菌の金属腐食能を解析し、*Shewanella* 属内の金属腐食菌の分布を明らかにする。
【方法】*Shewanella* 属細菌として、*S. algae* JCM 21037^T、*S. arctica* JCM 16723^T、*S. hanedai* JCM 20706^T、*S. japonica* JCM 21433^T、*S. kaireitica* JCM 11836^T、*S. marisflavi* JCM 12192^T、*S. oneidensis* JCM 31522^T、*S. putrefaciens* JCM 20190^T の 8 株を使用した。腐食試験には気相を N_2 /CO_2 (4:1,v/v)に置換した人工海水培地(Iino *et al.* 2015)を使用した。金属鉄 Fe^0 を電子供与体、硫酸塩または硝酸塩を電子受容体、酵母エキスを炭素源として、25℃で 30 日間静置培養を行った。その後、フェナントロリン法による鉄イオン溶出量の測定、イオンクロマトグラフィーによる NO_3^-の定量を行った。また、鉄鋼材料として広く使用される炭素鋼 SS400 やステンレス鋼 SUS316L を電子供与体とした腐食試験も同様に行った。
【結果および考察】硝酸塩および酵母エキスを添加した培地で培養した時、全 8 株とも鉄イオンの溶出量が無菌区の溶出量と比較して 2 倍以上高かった。硫酸塩を添加した培地では鉄イオンの溶出はなかった。よって、これらの菌株は硝酸塩還元に伴い鉄腐食を誘起することが明らかとなった。腐食した培地中では Fe^{2+}と Fe^{3+}が形成された。硫酸塩還元菌やメタン菌による MIC では Fe^{2+}のみ形成され、*P. denitrificans* MIC1-1 株による MIC では Fe^{2+}と Fe^{3+}が形成される。よって Fe^{2+}と Fe^{3+}の形成は硝酸塩還元菌共通の特徴であると考えられる。また、全 8 株ともステンレス鋼の腐食を誘起しなかったが、炭素鋼の腐食を誘起した。炭素鋼からの鉄イオン溶出量は金属鉄 Fe^0 を使用した時の溶出量と同等であった。これらの結果から、*Shewanella* 属細菌の幅広い種が MIC をもたらすことが明らかとなり、水圏域での MIC の原因の一つとなっている可能性が考えられる。

Shewanella, iron corrosion, nitrate reduction

発表責任者：飯野　隆夫（iino@riken.jp）

講演番号：2A11p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A11 会場

カキにおけるカドミウム結合物質の探索

Search for cadmium binding substance from oyster (*Crassostrea gigas*).

○川上 和宏[1]、陳 嘉上[1]、永田 宏次[1]、吉村 悦郎[1,2]、鈴木 道生[1] ([1]東京大農、[2]放送大)
○Kazuhiro KAWAKAMI[1], Chia-Shang Chen[1], Koji NAGATA[1], Etsuro YOSHIMURA[1,2], Michio SUZUKI[1] ([1]Graduate School of Agricultual and Life Sciences, The University of Tokyo, [2]The Open University of Japam)

１．背景・目的

カドミウムはイタイイタイ病の原因となった強い毒性を有する代表的な重金属である。ヒトにおいてはカドミウムに対する応答はよく研究されている。一方で、食用として重要な位置を占めるカキはカドミウムなどの重金属を蓄積しやすいことが知られており、その解毒に重要な役割を果たすカドミウムをキレートする分子としてはメタロチオネインのような金属結合タンパク質であること知られている。しかし、実際にカキにおいてカドミウムの存在形態の主体であるかについては不明である。カキ中でのカドミウムが結合する物質を探索することは、カキの食品としての安全性評価や無脊椎動物での重金属の防御機構の新たな知見につながることが考えられる。このため、カキ中からのカドミウム結合物質の分離及び精製を行い、カキ中でのカドミウムの化学形態を明らかにすることを目的とした。

２．方法・結果

カキの個体の解剖を行って内臓、外套膜、エラ、貝柱の４つの組織に分離した。各組織について誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-OES) を用いてカドミウム濃度を測定した結果、内臓に多くのカドミウムを蓄積していることが判明した。次に、カキの内臓を凍結粉砕して抽出バッファーを加えて超遠心を行ったところ、油層、上清、沈殿の３層に分かれた。この３層についてそれぞれ ICP-OES を用いてカドミウム濃度を測定した結果、上清に多くのカドミウムが存在していることが判明した。このため、内臓抽出液の上清を用いてカドミウム結合物質の探索を行うことにした。

まずは、得られた上清についてTPPS (5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphinetetrasulfonicacid) とカドミウムの錯体を用いたポストカラムキレーター法でのカドミウム結合物質の探索を行った。TPPSはカドミウムを配位することで吸収波長が414 nmから432 nmに変化することが知られており、カドミウム結合分子が存在するとTPPSの波長変化で検出することができる。この結果、カドミウムと結合すると思われる画分を得た。さらに、カドミウムをキレートしたアフィニティークロマトグラフィを行った。カドミウム添加の有無により、特異的にカラムに結合する成分の比較をSDS-PAGEで行ったところ、カドミウムと結合能のあるタンパク質をいくつか見出した。これらのタンパク質についてLC-MS/MSを用いて配列解析を行っている。

Crassostrea gigas, cadmium, metal binding protein

講演番号：2A11p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A11 会場

美容素材としてのオリーヴ枝の可能性について
The Benefits of Olive Branch for Skin
○岸本 憲人、岩田 佳奈（小豆島ヘルシーランド株式会社・オリーヴ健康科学研究所）
○ Norihito KISHIMOTO, Kana IWATA (Central Institute of Olive and Health Sciences, Shodoshima Healthyland Co., Ltd.)

【目的】近年、健康志向の高まりからオリーヴオイルの需要は年々増加している。オリーヴオイルは食用のみならず、スキンケア・美容用としても注目を集めている。当社では、自社農園で栽培したオリーヴから食用・美容オリーヴオイルを製造するだけでなく、搾油後の果実搾り滓、葉、枝などの未利用資源の健康・美容素材への転換を試みている。これまでに搾油後の果実搾り滓から抽出したエキスを配合した化粧水の開発や葉からの健康素材の開発にも成功している。本研究では、オリーヴ樹の剪定後に排出される枝に着目し、オリーヴ枝から抽出したエキスの美容機能性を検討した。本発表では美容素材としてオリーヴ枝の可能性について報告する。
【方法】自社農園で栽培したオリーヴ樹の剪定枝から溶媒（1,3-ブチレングリコール）を用いてエキス（以下、オリーヴ枝エキス）を抽出し、オリーヴ枝エキスの美容機能性を調べた。
【結果及び考察】ポリフェノール含量を指標として、オリーヴ枝エキスの抽出条件（抽出温度、抽出時間、枝投入量等）の最適化を行った。最適条件で抽出したオリーヴ枝エキスの抗酸化作用を調べたところ、高い ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity, 活性酸素吸収能力)値を示した。次に、オリーヴ枝エキスの紫外線(UV)吸収能を調べたところ、UV-A 波及び UV-B 波に相当する波長領域において高い吸収効果が認められた。さらに、オリーヴ枝エキスの美容機能性を調べたところ、線維芽細胞賦活作用、コラーゲン産生促進効果、メラニン産生抑制作用、保湿作用などの美容効果についても認められた。以上の結果から、オリーヴ枝エキスは、肌の抗酸化や肌細胞の代謝促進などの美容機能を有していることから、美容素材として十分に期待できることがわかった。

Olive, Polyphenol, Skin care

講演番号：2A11p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A11 会場

アセトン共存下における DNPH 含有フィルター上でのホルムアルデヒドの反応性
Reactivity of Formaldehyde in Acetone-Formaldehyde Mixtures on DNPH-impregnated filter

○井上 直子、鷹屋 光俊（労働者健康安全機構・安衛研）
○Naoko INOUE, Mitsutoshi TAKAYA (JNIOSH)

【背景と目的】

ホルムアルデヒドは，樹脂・接着剤の原料，防腐剤として広く産業利用があるが，鼻咽腔の発がん性が懸念され（国際がん研究機関の分類は人の発がん性ありのグループ１）ており，大気環境や室内環境等の有害な汚染物質としてモニタリングが行われている．労働安全衛生法においては，特定化学物質に指定されている（管理濃度 0.1ppm)．

労働環境中のアルデヒド分析法としては,2,4-dinitorophenylhidrazine (DNPH)捕集－HPLC 法が広く用いられ（特定化学物質関係－金属類を除く－，作業環境測定ガイドブック 3, (社)日本作業環境測定協会)，近年では，ポンプ装着などの作業者の負担軽減を目的としたパッシブサンプラーの活用が期待されている．DNPH はアルデヒドの他にケトン類とも反応し，アルデヒド類に加え，ケトン類の分析にも用いることは可能である．産業においては,アセトンが洗浄溶液や希釈剤として広く用いられているため，ホルムアルデヒドと同じ作業環境でより高濃度で存在し，ホルムアルデヒド測定の妨害となることが懸念される．

そこで本研究では，パッシブサンプラーにおける，アセトン共存下での DNPH とのホルムアルデヒド分析への影響を明らかにするため，DNPH との反応性について評価した．

【方法】

試験管にホルムアルデヒドパッシブサンプラー(SKC 社製)の捕集剤を入れ，ホルムアルデヒド及びアセトン水溶液（メタノールを含む）を滴下，アセトニトリルを加えて，撹拌し超音波により溶出後，HPLC（UV 360nm）で測定を行った．HPLC 条件は移動相(MeCN 50/蒸留水 50(v/v))，流速 1 mL/min，カラム(Kinetex C18，5μm，100mm×4.6mm)を用いた．また，捕集剤に含まれる DNPH 量はアセトンを用いて測定した．

【結果】

DNPH(7 μmol)>アセトン＋ホルムアルデヒドでは，定量的に反応が進行した．また，0.2ppm ホルムアルデヒド及び 8.75-1747ppm アセトンの 1 時間捕集相当量を，捕集剤に添加した結果，ホルムアルデヒドはアセトンより速く反応した．現在，パッシブサンプラーに用いられる捕集剤上での反応速度評価法の検討を行っている．

passive sampler, formaldehyde, DNPH

発表責任者：井上直子（inoue@h.jniosh.johas.go.jp）

講演番号：2A11p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A11 会場

浮遊粒子に含まれる生物情報に関する研究

Study on biological information included in particulate matter

○遠藤 優輝[1]、魯 文浩[1]、竹久 祥悟[1]、佐脇 和真[1]、岩橋 均[1]、高橋 淳子[2] ([1]岐阜大応微、[2]産総研)
○Yuki ENDO[1], Wenhao LU[1], Shogo TAKEHISA[1], Kazuma SAWAKI[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Junko TAKAHASHI[2] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

１．はじめに

空気中に浮遊する微粒子（＝粉じん）は金属を含む無機物と有機物から構成され、土壌、生物、燃焼、人為的な排気等を起源として発生し、大気中に飛散する。中でも、PM2.5と黄砂は、環境汚染粉じんとして知られており、それに加え、新種のインフルエンザや病原微生物、蹄疫等の病原ウィルスの蔓延、花粉症を引き起すスギ花粉等、大気中の微粒子の影響はヒトや家畜の健康影響を引き起すことが知られている。粉じんが引き起こす被害のリスクを評価し適切な対処をするためには、粉じんの起源を特定する必要がある。粉塵の特定法には化学的な分析法が主流であるが、粉塵には上述のように生物も含まれることが広く知られるようになっている。そこで、粉塵に含まれる生育地域が限定される植物や動物の遺伝子を解析することが有効であると考えた。本発表では、2年間にわたり粉塵を収集し、粉塵に含まれる植物および動物情報について解析したので報告する。

２．実験方法

2015年1月21日から2016年2月4日および2016年8月19日から2017年8月24日の計2年にわたり、約1ヶ月毎に粉じんを得た。粉じんはローボリウムエアサンプラー（AN-200型 アンダーセンタイプ、東京ダイレック㈱）により粒子径ごとに捕集した。このサンプラーは8段階に粒子径を分級可能である。これを、粒子径3.3 μmを境に2群に分け捕集し、市販のキット（Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境㈱）を用いてDNAを抽出した。得られたDNAは、*rbcL*（植物）および*co1*（動物）のプライマーにより増幅し、次世代シーケンサー（illumina MiSeq）によるメタゲノム解析を行った。

３．結果および考察

メタゲノム解析の結果、植物では風で花粉を飛ばす風媒花による花粉由来と思われる遺伝情報が多く検出された。また、季節毎に得られるデータ量が変動することから、気象状況なども関連する可能性が考えられる。動物では、昆虫の生物情報が多く得られた。ヒアリなどの外来種の検出は、粉じんの起源特定のみならず、生態系影響評価にも有用であると考えられる。

空気中に長く滞留し、かつ呼吸により人体に取り込まれ易い、微小な粉じんの解析は、地理的情報の取得、および生物被害の両面で有用と考える。本研究を展開することにより、近隣諸国間での粉塵を介した生物の連携状況や地域分布の把握に繋げたい。

NGS, rbcL, co1

発表責任者：遠藤優輝（v8121006@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A11p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A11 会場

栄養塩濃度変化が与える円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリス形成への影響
The concentrations of P and Ca in the media affect coccolith formation in *Pleurochrysis carterae*.
○新井 真子[1]、鈴木 道生[2]、長坂 征治[1] ([1]東洋大院生命、[2]東大院農)
○Mako ARAI[1], Michio SUZUKI[2], Seiji NAGASAKA[1] ([1]Toyo Univ., [2]Tokyo Univ.)

円石藻はハプト藻に属する海洋性の単細胞藻類で、細胞の周りにココリスと呼ばれる殻を保持している。ココリスの大きさは数μm で、円石藻の種ごとに異なる形態をしているが、多くの場合、石灰化によって形成された炭酸カルシウムの 2 種類の単結晶ユニットが組み合わさって構成されている。ココリスの大きさや形状を作り出すための緻密な結晶成長制御機構は未だにわかっておらず未解明である。多くの生物で観察される石灰化には、酸性の有機物質が関わっていることが知られており、ココリスからは３種類の酸性多糖 (PS-1, PS-2, PS-3) が単離され石灰化への関与が示唆されている。本研究では、ココリスに含まれる多糖類が持つ結晶成長制御機能の解明を目的とし、培地中の栄養塩濃度の変化による円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリスの形成量、形態や多糖量の変化を解析した。

リンあるいはカルシウム濃度を変化させた培地で *P. carterae* を 1 週間成育し、24 時間ごとに濁度、クロロフィル a 量を測定した。生育では培地中の栄養塩濃度による有意な差はみられなかったことから、次に培養後の細胞を回収し、ココリスおよび細胞中の金属含有量と走査型電子顕微鏡による形態観察を行った。低栄養塩濃度区では、細胞およびココリスにおいてカルシウム含有量がコントロールよりも減少しており、形態観察ではココリスが未成熟なものが多く球形を保てない細胞が観察された。一方、高栄養塩濃度区では細胞およびココリス中のカルシウム含有量がコントロールよりも増加していた。さらに、形態観察においてもココリスの結晶成長の促進がみられた。

培地中の栄養塩濃度がココリス形成へ影響を与えていることが示唆されたため、酸性多糖含有量にも影響がみられると予想し、培養後のココリスから抽出した酸性多糖含有量を測定した。カルシウム濃度変化では、培地中のカルシウム濃度に比例して酸性多糖含有量の増加がみられた。一方、リン濃度変化では、高濃度区およびココリスが未成熟であったリン欠乏区においても酸性多糖含有量がコントロールより増加していた。そこで HPLC を用いて抽出した糖サンプルの分画を行い、それらを用いて PAGE による分画の確認および 3 種の酸性多糖の比率の比較を行った。結果、リン欠乏区では酸性多糖を染色する Stains All では染色できない未知の酸性多糖が多量に含まれていることが明らかとなった。また、低栄養塩濃度区ではコントロールと比較して PS-1～3 の比率が異なっていた。これにより、ココリスの形成には酸性多糖量だけでなく組成比も重要であることが示唆された。

coccolithophore, coccolith, biomineralization

発表責任者：新井真子（boc.otl.apbtmaf@gmail.com）

講演番号：2A11p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A11 会場

露地精密農業の包括的土壌評価における土壌 ATP 量指標の活用可能性

Feasibility Study of Soil-ATP Analysis

○万里 千裕、五十嵐 由美子（（株）日立製作所)
○Chihiro MANRI, Yumiko IGARASHI (Hitachi,Ltd.)

【背景・目的】露地精密農業実現に向け，複雑で多様なばらつきをもつ圃場に対し，地力構成要素である物理性・化学性・生物性を包括的に評価するシステムの構築を目指している。生物性情報のひとつである土壌微生物は，微生物量解析，微生物多様性解析などを用いて計測する。土壌 1g には，1～100 億個の土壌微生物が存在し，その 99%以上の微生物種が難培養菌であるため，直接的な計数は困難であり，近年，土壌微生物量を DNA 量から推定する方法が提案されている。
日立では，製薬用水検査を目的に高感度 ATP 計測法を用いた微生物迅速検査技術を保有している[1]。本研究では，ATP 生物発光法を用いて土壌 ATP 量から微生物量を推定し，土壌状態を評価した結果について報告する。
【方法・結果】栽培作物種や肥料状態などが異なる 14 種類の土壌試料から ATP を抽出し，DNA 量との関係を確認した。結果，土壌から抽出した ATP 量と DNA 量には高い正の相関（R^2=0.92）があり，土壌 ATP 量から土壌微生物量を推定可能であることを明らかにした。
次に，本 ATP 法を堆肥施用の異なるパプリカ栽培区（元肥に堆肥を施用した区画（堆肥(+)）と施用しない区画（堆肥(-)））の土壌微生物評価に適用し，土壌 ATP 量を指標とした土壌状態の評価が可能かを検証した。一般的に，堆肥は微生物量を増加させ肥沃な土壌にするために施用する。本結果においても，パプリカの収量は堆肥を施用した方が収量が高く，堆肥(+)区が 1311.6g／株，堆肥(-)区が 1035.6g／株であった。
パプリカ栽培中の約 8 ヶ月間，各区画（堆肥(+)，堆肥(-)）から 2 ヶ月ごとに土壌をサンプリングし，抽出した ATP 量の経月変化を計測した。その結果，堆肥(-)区の土壌 ATP 量は経月変化がみられなかったのに対し，堆肥(+)区では堆肥施肥後 3 ヶ月の土壌で ATP 量が増加し，その後，減少した。本結果から，土壌 ATP 量が肥沃度の指標になることが示された。
更に，硝酸態窒素含量や土壌微生物多様性の経月変化が，土壌 ATP 量の経月変化と同様な傾向を示したことから，土壌 ATP 量が土壌微生物量・硝酸態窒素含量・微生物多様性等の土壌状態を把握する情報として有効であることが示された。今後は，様々な土壌に本 ATP 法を適用することでナレッジを蓄積し，物理性，化学性と合せた包括的土壌評価システムの構築を目指す。

[1] Okanojo M. *et.al*：Attomol-level ATP bioluminometer for detecting single bacterium. Luminescence. 2017 Aug;32(5):751-756

precision soil culture, ATP bioluminescence

講演番号：2A12a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A12 会場

酸素ラジカル処理による植物バイオマス分解の活性化

Oxygen-radical pretreatment promotes cellulose degradation by cellulolytic enzymes

○祖父江 真帆[1]、酒井 杏匠[1]、上條 順也[1]、糀谷 紗季[1]、田中 優太[2]、田中 健太[1]、前林 正弘[1]、呉 準席[2]、伊藤 昌文[2]、堀 勝[3]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大・農、[2]名城大・理工、[3]名大・未来社会創造機)
○Maho SOBUE[1], Kiyota SAkAI[1], Junya KAMIJO[1], Saki KOJIYA[1], Yuta TANAKA[2], Kenta TANAKA[1], Masahiro MAEBAYASHI[1], Jun-Seok OH[2], Masafumi ITO[2], Masaru HORI[3], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ.Agric., [2]Meijo Univ.Sci.Technol., [3]Inst.Innovat.Future Soc.,Nagoya Univ.)

【目的】
セルロース分解の効率化は、バイオ燃料製造を含むバイオリファイナリープロセスにおいて重要である。酸およびアルカリ前処理のような化学的方法は広範に用いられており、難分解性リグノセルロース構造を破壊するのに有効であることが実証されている。しかしながら、これらの方法は環境に有害な影響を及ぼし、耐酸性、耐アルカリ性の設備および中和工程が必要になるため、新しい方法の確立が期待されている。本研究では、プラズマによって生成する酸素ラジカルの高い反応性に着目し、酸素ラジカル処理がカルボキシメチルセルロース (CMC)、結晶性セルロース (MCC) および、麦わらの酵素分解に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】
酸素ラジカル処理または酸素ガス処理（コントロール）した CMC 溶液の粘度を測定したところ、酸素ラジカル処理によって、CMC 溶液の粘度が低下した。このことから、セルロース鎖が開裂し、低分子化していることが示された。さらに、酸素ラジカル処理した CMC を *Phanerochaete chrysosporium* の培養上清と反応させ、DNS 法を用いて反応溶液中の還元糖量を測定した。コントロールと比較して、酸素ラジカル処理によって反応溶液中の還元糖量が 2.0 倍増加した。 *P. chrysosporium* 培養上清中の細胞外タンパク質を 2 次元電気泳動によって分離し、プロテオーム解析を行ったところ、Glycoside hydrolase 7 (GH7) ファミリーに属するセロビオヒドロラーゼ I および GH6 ファミリーに属するセロビオヒドロラーゼ II が主要なセルロース分解酵素として検出された。市販のセロビオヒドロラーゼ I および II と、酸素ラジカル処理した CMC を反応させ還元糖量を定量したところ、コントロールに比べて 1.7 倍高かった。また、酸素ラジカル処理した麦わらを *P. chrysosporium* 培養上清と反応させたところ、還元糖量が 1.8 倍多くなった。これらのことから、プラズマ処理はセルラーゼによるセルロース分解を促進することが明らかになった。以上のことから、植物バイオマスの酸素ラジカル処理は、リグノセルロース分解プロセスの改善に貢献できる可能性が示唆された。[1)]

[1)] Sakai *et. al.*, Oxygen-radical pretreatment promotes cellulose degradation by cellulolytic enzymes. (2017) Biotechnol for Biofuels, in press

atmospheric pressure plasma, oxygen radical pretreatment, plant biomass

発表責任者：加藤雅士（mkato@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：2A12a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A12 会場

シロイヌナズナを利用したリグニン改変遺伝子の探索
Screening of genes modifying lignin using *Arabidopsis thaliana*
○徳江 洋介[1,2]、坂本 真吾[1]、上村 直史[2]、梶田 真也[3]、政井 英司[2]、光田 展隆[1]([1]産総研・生物プロセス、[2]長岡技科大・生物、[3]東京農工大・生物)
○ Yosuke TOKUE[1,2], Shingo Sakamoto[1], Naofumi Kamimura[2], Shinya Kajita[3], Eiji Masai[2], Nobutaka Mitsuda[1] ([1]BPRI, AIST, [2]Nagaoka Univ. Tech, [3]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【背景・目的】芳香族高分子であるリグニンは、その疎水性・頑強性ゆえに植物の生育に不可欠な自立や通水といった基本機能を付与する。しかしながらその特性は、リグノセルロースバイオマスからのバイオ燃料生産といった工業利用において最も大きな障害にもなっている。2007 年に Chen と Dixon はリグニンの改変がバイオ燃料生産の効率化に有効であると提唱した (*Nature Biotechnol*)。リグニンの合成原料となるモノリグノールは、フェニルアラニンを出発物質としケイ皮酸モノリグノール経路により生産される。これまでに、リグニン改変を目的として本経路を担う遺伝子の破壊・発現抑制が多数実施され、実際にリグノセルロースの糖化性を向上できることが証明されてきた。一方、Eudes らはバクテリアのモノリグノール前駆体変換酵素遺伝子を植物で発現させることにより、リグニンを改変し糖化性を向上させることに成功している (*Plant Biotechnol J, 2012*)。本研究では、遺伝子資源の豊富さを活かせる後者の遺伝子発現によるリグニン改変手法に着目し、植物に導入・発現させることで糖化性を向上し得る有用な酵素遺伝子をハイスループットにスクリーニングした。
【方法・結果・考察】モノリグノール生合成経路に登場する芳香族カルボン酸、アルデヒド、アルコール、CoA エステル類 23 種類のいずれかに対して酸化、還元、エステル化等の変換能を有する既知の酵素遺伝子を植物、バクテリア、真菌から 50 種類選定し、シロイヌナズナでの発現用にコドンを最適化して遺伝子合成した。各遺伝子を交雑ヤマナラシ由来の C4H プロモーター下流に連結して発現ベクターを構築しアグロバクテリウムに導入した。多種類の遺伝子を効率的に植物に導入するため、1 グループあたり 6～8 種類の形質転換アグロバクテリウムを混合してシロイヌナズナに感染させ、計 7 グループのバルク形質転換種子を得た。抗生物質耐性を指標に選抜した形質転換植物約 350 株について導入された遺伝子を同定するとともに、土に移植後約 5 週間生育させた花茎を用いて各種分析を行った。花茎の基部より 2 cm の部位から切片を調製し、モイレ染色、フロログルシノール染色によりリグニンの変化を観察した。その結果、計 6 遺伝子の導入株において呈色の強度もしくは色味の変化が観察され、リグニン量や構成要素の種類・比率が変化したと推察された。また基部より 2-7 cm の花茎から細胞壁精製物を調製し 50°C で 24 時間の酵素糖化処理を行い、遊離グルコース量を測定した。その結果、上述の 6 遺伝子含む計 9 遺伝子では野生株比でグルコース量が 30～137%増大し、糖化性が向上したことが認められた。以上より、本アプローチでは 50 種類の遺伝子からリグニン改変および糖化性向上に効果的な遺伝子を発見することに成功した。

lignin modification, *Arabidopsis thaliana*, glucose productivity

発表責任者：徳江洋介（y.tokue@aist.go.jp）

講演番号：2A12a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A12 会場

孟宗竹の総合利用に関する研究

Studys on biorefinary of Moso-bamboo.

○関本 智登[1]、藤田 誠史[2]、大場 尚子[2]、安部 智子[1,2]、椎葉 究[1,2]([1]東京電機大学 生命理工学専攻、[2]東京電機大学 生命理工学系)
○Tomotaka SEKIMOTO[1], Seiji HUJITA[2], Naoko OOBA[2], Tomoko ABE[1,2], Kiwamu SIIBA[1,2]
([1]Tokyo Denki Univ. LSE, [2]Tokyo Denki Univ. DLSE)

[目的]

孟宗竹は、西日本を中心に大量繁茂し、竹害という環境問題を引き起こしている。このように日本国内に豊富に存在するバイオ資源であり、成長が早く木質と比較してセルロースやヘミセルロースが豊富でリグニンが少ない点から注目されている。当研究室では孟宗竹のこれらの特徴に着目し、孟宗竹の総合利用に関する研究を行なってきた。これまでに孟宗竹から高温高圧処理と酵素処理により調製した竹粗抽出物が、in vitro での強い抗酸化活性や、血しょうコレステロール上昇抑制効果等を有することを明らかにしてきた。

しかし、竹粗抽出物中のこれらの生理活性効果を有する成分の組成や化学構造についての相関性は明確に得られていない。そのため本研究では、孟宗竹から抽出した BOS 中成分を分画し、含まれる成分の構造と生理活性の相関性を明確にすることを目的とした。

[方法]

・孟宗竹のチップに蒸留水を加え、蒸圧処理を行なった後、細胞壁崩壊酵素により処理し、そのろ液を竹粗抽出物(Bamboo oligo-saccharides:以下BOS)として回収し、凍結乾燥を行ない粉末状にした。
・BOS 中成分の分画を, Cellufine MAX Phenyl(JNC 株式会社製)を担体として用いたカラムクロマトグラフィー法により分画した。分画の溶離液として、MilliQ 水,20%EtOH,50%EtOH,100%EtOH を用いた。
・各画分の収量(乾物)、全糖量、抗酸化能(DPPH 消去活性法)、総ポリフェノール量の測定を行なった。
・各画分を酸加水分解後、HPLC を用いて構成糖分析を行なった。
・MS 分析により構造の検討を行なった。
・分画成分の血しょうコレステロール上昇抑制効果を高脂肪食供与したマウスを用いて試験した。

[結果および考察]

①Cellufine により分画した各画分の乾物 1mg に対する抗酸化活性は、20%EtOH 画分が最も高い抗酸化活性を示した(0.77 μmol/mg)。また、乾物 1mg 中の総ポリフェノール量は 20%EtOH 画分が最も多かった(0.12mg)。
②各画分の構成糖比は、水画分は Glucose : Xylose : Galactose (1.0 : 2.9 : 0.2)、20%EtOH 画分は(1.0 : 0.5 : 0.0)、50%EtOH 画分は(1.0 : 0.26 : 0.0)であり、Xylose の比率は水溶性画分が最も多かった。

Moso-bamboo, Biorefinary, Plasma cholesterol

講演番号：2A12a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A12 会場

工場排水を用いたウキクサバイオマス生産への取り組み

Approach to the production of duckweed biomass using factory wastewater

○小林 美水[1]、岡田 全朗[2]、小山 時隆[2]、遠山 忠[3]、森 一博[3]、三輪 京子[1]、森川 正章[1]([1]北海道大院・環境、[2]京都大院・理、[3]山梨大院・総合)
○Yoshimi KOBAYASI[1], Masaaki OKADA[2], Tokitaka OYAMA[2], Tadashi TOYAMA[3], Kazuhiro MORI[3], Kyoko MIWA[1], Masaaki MORIKAWA[1] ([1]Grad. School of Environ. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. School of Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Facul. Int. Res., Univ. Yamanashi)

【背景・目的】浮遊性水生植物のうちウキクサ亜科植物（以下、ウキクサ）は、タンパク質およびデンプン蓄積能に優れているためバイオマスとしての価値が高い。これまでに私たちは、共生細菌を利用してウキクサの成長が促進できることを報告して来た。本研究では、実用的な低炭素技術開発を目的として、工場排水を利用したウキクサバイオマス生産に向けた条件検討を行った。
【方法・結果】まず、排水で生育可能なウキクサ種の選定を行ったが、２種を除くほとんどのものは原液排水では生育せず枯死した。そこで、生育阻害をもたらしている可能性のある過剰イオンを沈殿除去するために 10mM 塩化カルシウムを添加したところ、多くのウキクサ種で生育が改善した。一方、排水中に不足している主要ミネラル５種について、模擬排水を作成し添加試験を行った。その結果、0.02 mM 鉄-EDTA の添加により生育がさらに改善した。また興味深いことにこの生育改善効果は EDTA 単独添加でも再現できたが EGTA は無効であった。またウキクサ栽培に伴う光照射によって、排水の着色成分が低減できることが分かった。現在、共生細菌による成長促進効果および最適な CO_2 供給濃度について検討している。

本研究は、科学技術振興機構(JST)先端的低炭素技術開発(ALCA)「共生微生物を活用した水生バイオマスの効率生産」の一環として実施した。

Duckweed, Biomass production, Plant Growth-Promoting bacteria

講演番号：2A12a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A12 会場

リグニン分解微生物とセルロース分解微生物を併用した、バイオエタノール生産法の検討

Bioethanol production using lignolytic and cellulolytic microbes

○野本 梨惠、白井 拓磨、藤井 克彦 (山口大農)
○Rie NOMOTO, Takuma SHIRAI, Katsuhiko FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】

演者らはこれまでに様々な土壌からセルロース分解微生物の分離を行い、その微生物生態系について検討してきた。今回、森林土壌から得たセルロース分解糸状菌（*Trichoderma* sp. IR92 株、同属 IR1502 株、同属 YNB26 株）が他の研究室保有株と比較して高いセルラーゼ活性を持つことがわかった。そこで本研究では、各種農産廃棄物に対する分離株の分解能をセルラーゼ活性を指標にして比較検討するとともに、分離株酵素と酵母菌を併用することで農産廃棄物から直接バイオエタノールを生産できないかを検討した。

【方法】

YM 培地（1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract）で予備培養した菌膜をガラス管でくり抜き、農産廃棄物を含むペプトン系培地(1.0g 農産廃棄物, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract）または無機塩類培地（1.0g 農産廃棄物, 0.67% Yeast Nitrogen Base）に接種し、30℃で 1 週間静置培養を行った。培養後に上清を回収し、エキソセルラーゼならびにエンドセルラーゼ活性を測定し、その農産廃棄物に対する分解能を検討する指標とした。酵素活性は Ghose（1987）の方法により測定した。また、限外ろ過（MWCO 10,000）を用いて培養上清を分画し、これをリグニン分解酵素を生産するカワラタケ *Trametes versicolor* の酵素液および酵母菌とともに農産廃棄物が入ったガラスバイアルに加え、窒素を充填して 1 週間静置培養した。培養後にエタノール濃度を測定し、いずれの株がバイオエタノール生産に適しているかを検討した。

【結果】

約 10 種類の農産廃棄物を基質として培養してみた結果、分離株 IR92 株、IR1502 株、YNB26 株はいずれも樹皮、麦藁、緑茶抽出滓、柑橘果皮で培養した時に良好に生育し、比較標準株（*T. reesei* NBRC 31326^{T}および *Trametes versicolor* NBRC 30340）と同等またはそれ以上のセルラーゼ活性を持つことがわかった。また、樹皮を基質としてエタノール発酵を試みた結果、分離株の培養上清あるいは限外ろ過（分子量 10,000 以上）画分を加えた場合に、酵母菌のみの場合と比較して高いエタノール生産量が確認できた。いくつかの株では、*Trametes versicolor* の限外ろ過（分子量 10,000 以上）画分と合わせて加えることでさらにエタノール生産が促進された。

lignocellulose, cellulase, bioethanol

講演番号：2A12a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A12 会場

水酸化カルシウムと混合ー湿式粉砕後に常温貯蔵処理を行った稲わら、エリアンサスの Ca 洗浄・糖化効率評価
Addition of washing step in RT-CaCCO pretreatment method increases the saccharification efficiency of rice straw and Erianthus foriage.
○山岸 賢治[1]、池 正和[1]、関 笛[1]、我有 満[2]、徳安 健[1]([1]農研機構食品研究部門、[2]農研機構食品中央農業研究センター)
○Kenji Yamagishi[1], Masakazu Ike[1], Di Guan[1], Mitsuru Gau[2], Ken Tokuyasu[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]Central Region Agricultural Research Center, NARO)

【背景・目的】稲わらは日本で最も大量に発生する農産廃棄物であり、その有効利用は農家の収入と雇用の場を確保する上で役立つと考えられる。稲わらの特徴として、①一年の特定時期に集中して発生すること、②収穫時期に降雨があると、その後の乾燥が不十分な場合速やかに腐敗すること、の二点が挙げられる。そのため我々は、稲わらを湿潤状態で $Ca(OH)_2$ と湿式粉砕後、常温貯蔵によって前処理を行い、CO_2 中和後に糖化を行う方法（RT-CaCCO 法）の開発を行ってきた。本法は $Ca(OH)_2$ の示す強いアルカリ性によって腐敗を防ぎ、かつリグニン、キシランの部分的分解（前処理効果）によって糖化効率を上昇させることを特徴としている。ただしこれまでの RT-CaCCO 法では、中和反応によって生じる $CaCO_3$ が中性～弱アルカリ性を示すため、糖化時には耐圧容器を用いて CO_2 を加圧し、糖化酵素群が高い活性を示す弱酸性域まで pH を低下させる必要があった。そこで本研究では、$Ca(OH)_2$ を混和して湿式粉砕処理を行った稲わらを、常温貯蔵後に洗浄して Ca を除去することにより、CO_2 を加圧することなく糖化反応が可能になるか否かを検討した。また除去した Ca の回収、再生可能性についても検討した。

【方法と結果】稲わら（2013 年度産コシヒカリ）を $Ca(OH)_2$ と混合し、湿式粉砕して常温貯蔵を行った。稲わらを水洗浄し、Ca を除去した場合には、稲わら中に存在していた Ca の約 40 %が残留していた。一方、水洗による Ca 除去後、CO_2 を通気して難溶性の $Ca(OH)_2$ を溶解度が高い $CaHCO_3$（炭酸水素カルシウム）にした場合、稲わら中 Ca の 90 %が溶出した。CO_2 通気によって溶出した炭酸水素カルシウムは、逆に空気を通気することにより $CaCO_3$ として析出したため、焼成によって酸化カルシウムに変換することが可能であった。次に未洗浄の常温貯蔵後稲わら（湿式粉砕処理稲わら）、水のみで洗浄した湿式粉砕処理稲わら、及び CO_2 を通気した湿式粉砕処理稲わらにセルラーゼを添加し、糖化効率の評価を行った。各稲わらを気密バイアルに入れ、気相を CO_2（大気圧）、及び加圧した CO_2 とした結果、CO_2 を通気して洗浄した湿式粉砕処理稲わらでは、加圧の有無に関わらず全グルカンの約 70 %が可溶化した。未洗浄、及び水洗浄した湿式粉砕処理稲わらでは、CO_2 を加圧しない場合全グルカンの 40 %～55 %が可溶化した。CO_2 加圧によって糖化率は上昇したが、CO_2 を通気した湿式粉砕処理稲わらよりも糖化効率は低かった。本発表では、資源作物エリアンサスの洗浄結果も併せて報告する。

Ca(OH)2 treatment, rice straw, washing step

発表責任者：山岸　賢治（yamagisi@affrc.go.jp）

講演番号：2A12a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A12 会場

海洋性菌叢によるキチン含有廃棄物からの有用物質生産

Bioconversion of chitinous waste into useful materials by marine bacterial consortium

○喜多 晃久[1,3]、三浦 豊和[1,3]、岡村 好子[1,3]、秋 庸弘[1,3]、松村 幸彦[2,3]、田島 誉久[1,3]、加藤 純一[1]、中島田 豊[1,3]（[1]広大院・先端研、[2]広大・工、[3]JST-CREST）
○Akihisa KITA[1,3], Toyokazu MIURA[1,3], Yoshiko OKAMURA[1,3], Tsunehiro AKI[1,3], Yukihiko MATSUMURA[2,3], Takahisa TAJIMA[1,3], Junichi KATO[1], Yutaka NAKASHIMADA[1,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Fac. Eng., Hiroshima Univ., [3]JST-CREST)

エビやカニの殻などの構成成分であるキチンは、N-アセチル-D-グルコサミンからなる多糖であり、地球上でセルロースの次に豊富なバイオマスであると言われている。エビやカニの水産加工の際に大量に生じるキチン含有廃棄物は毎年 600～800 万トン排出されると推定されているが、そのほとんどが利用されずに廃棄されている。近年では、キチン分解物やキチンナノファイバーなどの利用が健康食品分野や医療分野などで期待されているが、その生産や利用は限定的であり、全てのキチン含有廃棄物を処理することは極めて困難である。また、キチンを基質とした微生物による燃料生産に関する研究も報告されているが、未処理のキチン含有廃棄物やキチンそのものを安定かつ効率的に微生物変換することができたという報告は、我々の知る限りこれまでにない。もし、キチン含有廃棄物をバイオ燃料や有用物質へ微生物変換することができれば、世界規模でキチンバイオリファイナリーを構築することができる。そのような中で、我々は海洋環境中の微生物共生システムに着目し、キチンを安定かつ効率的に分解し、有機酸やメタンを生産することができる海洋性菌叢の取得に成功した。

本研究で取得した海洋性菌叢は 5g/l のキチンを 14 日間で分解し、1732ml/l のメタンを生産することができた。本菌叢はさらに、未処理のエビ殻およびカニ殻を安定的に分解することができ、30g/l の未処理のエビ殻（VS 換算で 5g/l）を 1 週間で分解し、最大で 480m/l/d の速度でメタンを生成することができた。本菌叢および構成菌は耐塩性を持つため、水産加工や食品産業における高塩分含有廃棄物の処理に用いることもできる。さらに、海水を利用することができるため淡水の節約も可能である。

本菌叢からキチン分解菌の単離を試みたが、現在までに単離できていないため、微生物共生系によるキチン分解機構の存在が示唆された。16S rRNA 遺伝子系統解析の結果、*Christensenella* 属細菌や *Prolixibacter* 属細菌などが優占種であり、新種である可能性が示された。また、メタゲノム解析の結果、キチン分解に関与する全ての遺伝子が確認されたことから、本菌叢は耐塩性キチン分解微生物の優れた供給源としてだけでなく、キチン分解遺伝子群の供給源としても期待される。

chitin, methane, bacterial consortium

講演番号：2A12a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A12 会場

β-グルコシダーゼ発現大腸菌体添加による嫌気性細菌のセルロース糖化

Cellulose saccharification with an anaerobe

○苅田 修一[1]、市原 舞子[2]、市川 俊輔[3]、小杉 昭彦[4] ([1]三重大生資、[2]三重大地域イノベ、[3]三重大教育、[4]JIRCAS)
○Shuichi Karita[1], Maiko Ichihara[2], Shunsuke Ichikawa[3], Akihiko Kosugi[4] ([1]Mie Univ. Biores, [2]Mie Univ. RIS, [3]Mie Univ. Edu, [4]JIRCAS)

［目的］ *Clostridium thermocelum* は、酵素複合体セルロソームを生産することにより、効率的にセルロースを分解することが知られている。セルロースを炭素源として *C. thermocellum* を培養する際に、β-グルコシダーゼ(BGL)を添加することで、培養液中にグルコースが蓄積することが報告されている。本研究では、精製した BGL の代わりに BGL を発現した大腸菌の菌体を直接 *C. thermocellum* の培養液に添加することにより、グルコースの生産を試みた。

［実験方法・結果］ 好熱性細菌 *Thermoanaerobacter brockii* 由来の BGL 遺伝子(CglT)を発現ベクター pQE30 に導入し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。*C. thermocellum*o の生育温度 60℃での CglT を発現した大腸菌の死滅・溶菌を確認するために、5mL の培養液から集菌した大腸菌(6.24×10^8 cells/mL)を 60℃にて BM7CO 培地で、12 時間インキュベートすると、菌体外において 0.2U/mL の BGL 活性を確認した。これふまえ、5%ボールミルセルロース (BMC) を含む BM7CO 培地に、*C. thermocellum* DSM1313 株を接種し、これに 12.5 mL の培養液から集菌した CglT 発現大腸菌(6.82×10^8 cells/mL)を添加した。これを 60℃で 7 日間培養したところ BMC は消失した。培養液中のグルコース濃度を測定した結果、７日後で 3.6%となった。また同様に行った精製した CglT を添加した実験ではグルコース濃度は 3.4%であり、CglT 発現大腸菌体の添加は、グ精製した CglT を用いた場合と同等の効果があった。炭素源を 10%アビセルにして、3 日間培養させた結果、アビセルの完全な消失には至らなかったが、5.1%のグルコースを生産した。

［考察］ *C. thermocellum* は、セロビオース以上のセロオリゴ糖を好んで利用し、グルコースをほとんど利用しないことが知られている。また、セルロソームによるセルロースの加水分解は、セロビオースにより生成物阻害をうける。BGL の添加により、この阻害が緩和されることにより、セルロースの分解が促進され、グルコースが培地中に蓄積すると考えるころができる。本研究では、BGL を精製しなくても、発現している大腸菌菌体を添加することで、培養条件下で、溶菌を促し、簡易な方法で、グルコースをつくることができた。

cellulose saccharification, Clostridium thermocellum, glucose production

発表責任者：苅田修一（karita@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A12a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A12 会場

好熱嫌気性セルロソーム生産菌 *Herbivorax saccincola* A7 の特徴とゲノム解析
Characterization and genome sequence of an anaerobic, thermophilic cellulosome-producing bacterium *Herbivorax saccincola* A7

○藍川 晋平[1]、BARAMEE Sirilak[2]、SERMSATHANASWADI Junjarus[2]、THIANHENG Phakhinee[1]、四方 亜弓[3]、荒井 隆益[1]、WAEONUKUL Rattiya[2]、小杉 昭彦[1,3]（[1]国際農研、[2]KMUTT、[3]筑波大院生命環境）
○ Shimpei AIKAWA[1], Sirilak BARAMEE[2], Junjarus SERMSATHANASWADI[2], Phakhinee THIANHENG[1], Ayumi SHIKATA[3], Takamitsu ARAI[1], Rattiya WAEONUKUL[2], Akihiko KOSUGI[1,3] ([1]JIRCAS, [2]KMUTT, [3]Univ. Tsukuba)

【背景】
リグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料やバイオ化成品原料の生産プロセスの構築が求められている。好熱嫌気性菌の*Clostridium thermocellum*などはセルロソームと呼ばれるセルラーゼ複合体により、結晶性セルロースを効率的に糖化できる。しかし、*C. thermocellum*はリグノセルロース系バイオマスにセルロースに次いで含まれるキシランを資化できないため、セルロースとキシランを両方利用できる菌が求められている。これまでにも*C. clariflavum* 4-2aや*C. cellulovorans* 743Bなどのセルロースとキシランを両方資化できるセルロソーム生産菌の研究が行われている。本研究では、これまでのセルロソーム生産菌とは異なる生育条件（アルカリ性）でセルロースとキシランを両方資化できる好熱嫌気性菌を単離し、その生理学的特性や特徴的な遺伝子を調べた。
【材料と方法】
石垣島のバイオコンポストから、コーン茎葉を炭素源として高い分解能を有する好熱嫌気性細菌群を獲得し、A7 株を単離した。至適 pH や至適温度、糖資化性などの生理学的特性を調べ、16S rRNA 系統解析や DNA-DNA 分子交雑法で、A7 株の種同定を行った。さらに 1 分子リアルタイム DNA シーケンサーにより A7 株のゲノムを解読し、好熱嫌気性菌である *C. thermocellum* 及び *C. clariflavum* のゲノム情報との比較により、A7 株のリグノセルロース分解の特徴を解析した。
【結果と考察】
単離された A7 株は、16S rRNA 系統解析や DNA-DNA 分子交雑法の結果から、近年、新属新種として登録された *Herbivorax saccincola* であったが、菌体脂肪酸組成と至適生育 pH (pH9.0)に違いが認められた。ゲノムシーケンス解析により、*H. saccincola* A7 は *C. thermocellum* や *C. clariflavum* と同様に、セルロソームを有していることが明らかとなった。*H. saccincola* A7 は、*C. thermocellum* や *C. clariflavum* と比べて、GH2 や GH11 に属する糖質分解酵素が多く、ヘミセルロースに対応する分解酵素を持っていることがわかった。

lignocellulosic biomass, cellulosome, xylanase

講演番号：2A12a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A12 会場

Clostridium cellulovorans による多様なセルロース系バイオマスを活用したバイオリファイナリー構築

Constructing bio-refinery using various cellulosic biomass by *Clostridium cellulovorans*

○富田 寿男[1]、岡﨑 文美[1,2,3]、田丸 浩[1,2,3]（[1]三重大学生物資源、[2]三重大学生物資源バイオインフォ、[3]三重大学生物資源スマートセル）

○ Hisao TOMITA[1], Fumiyoshi OKAZAKI[1,2,3], Yutaka TAMARU[1,2,3] ([1]Mie Uni., [2]Mie Uni. Bioinfomatics, [3]Mie Uni. Smart Cell Innovation)

再生可能エネルギーの普及のために，固定価格買取制度（FIT）などを国策として推進し太陽光発電が急速な広がりを見せた．しかし昼夜，天候に左右される太陽光発電は電力系統連携上の問題も多く，固定価格買取制度が改定され安定供給が可能なバイオマス発電へシフトしつつある．制度改定は国産間伐材の有効利用を念頭に置いていたが，林業連携に課題があり，海外からの PKS（ヤシ殻）に頼っているのが現状で，早くも PKS の奪い合いが懸念され始めている．

成長が早く，二度収穫可能なソルガムは，年間 17 トン/ha（乾燥重量）ものバイオマス量が見込める作物である．過去に，糖を豊富に含むソルガム搾汁液をアルコール発酵しバイオエタノールを生産する研究は行われてきたが，そのバイオマス主成分であるセルロースを分解・利用する研究報告は少ない．

Clostridium cellulovorans はセルロソームを生産し，高いセルロース分解能を有する絶対嫌気性菌である．本研究では酸やアルカリによる前処理を行わずに，Clostridium cellulovorans を用いたセルロース系バイオマスであるソルガム分解を報告する．分解し得られた糖を利用したバイオガス生産を組み合わせることにより，輸入 PKS に依存しないバイオガス発電を実現することができる．

加えて Clostridium cellulovorans による温州みかん搾りかすや果皮，シュガービートパルプなど非可食バイオマスに対する分解能も紹介し，Clostridium cellulovorans が特定のバイオマスでなく，土地に応じた様々なバイオマス分解に広く利用可能であることを示す．

Clostridium cellulovorans, bio-refinary, cellulosic biomassa

発表責任者：田丸浩（ytamaru@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A12a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A12 会場

堆肥から分離したリグノセルロース可溶化能を有する好熱嫌気性微生物集団の特徴化

Characterization of biological lignocellulose solubilization by thermophilic anaerobic microbial communities isolated from bio-compost.

○四方 亜弓[1]、SERMSATHANASWADI Junjarus[2]、THIANHENG Phakhinee[3]、WAEONUKUL Rattiya[2]、NHIM Sreyneang[2]、UNGKULPASVICH Umbhorn[1]、長岡(中薗) 栄子[3]、藍川 晋平[3]、荒井 隆益[3]、小杉 昭彦[1,3] ([1]筑波大院生命環境、[2]KMUTT、[3]国際農研)
○ Ayumi SHIKATA[1], Junjarus SERMSATHANASWADI[2], Phakhinee THIANHENG[3], Rattiya WAEONUKUL[2], Sreyneang NHIM[2], Umbhorn UNGKULPASVICH[1], Eiko NAKAZONO-NAGAOKA[3], Shimpei AIKAWA[3], Takamitsu ARAI[3], Akihiko KOSUGI[1,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]KMUTT, [3]JIRCAS)

【背景と目的】

リグノセルロース系バイオマスから、環境負荷をかけずにバイオエネルギーへの変換技術の確立は必要である。そのため、できるだけ低環境負荷の前処理と共に、生物学的処理法によりリグノセルロース系バイオマスを可溶化できる技術およびプロセス開発研究は、バイオマスから効率的にバイオガス生産するにあたり極めて重要と考える。本研究では、粉砕処理した様々なバイオマスを用い、高温下にて効率的可溶化能を有する嫌気性微生物集団を単離し、構成する微生物メンバーの解析を行った。

【実験材料と方法】

石垣島の堆肥を分離源として、2%(w/v)の各粉砕バイオマス（コーン茎葉、サトウキビバガス、稲わら等）を含む合成培地に対して、高い可溶化能を有する好熱嫌気性細菌群をスクリーニングした。各粉砕バイオマスにおいて生育する微生物種の全体像を理解するため、16SrRNA を調製、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)を用いて泳動パターンおよびシーケンスの比較を行った。また各培養液から経時的な 16S rRNA を調整し、次世代シークエンサーによるメタゲノム解析を行った。

【結果及び考察】

スクリーニングから最も高い可溶化率を示した微生物集団 ISHI-3 は、DGGE 解析およびメタゲノム解析の結果より 3 種の新種を含む、4 種類の好熱嫌気性細菌 *Herbivorax saccincola*、*Tepidimicrobium* sp. *Caldicoprobacter* sp.そして *Tepidanaerobacter* sp.によって構成されていることが明らかとなった。上記嫌気性細菌の経時的構成比は、いずれのバイオマスを炭素源に用いた場合においても、培養初期からバイオマス可溶化が進む中期にかけて *H. saccincola* 及び *Caldicoprobacter* sp.が主に優勢となり、培養後期になるに従い *Tepidimicrobium* sp.や *Tepidanaerobacter* sp.が増加する傾向となった。ISHI-3 の微生物集団において、*H. saccincola* は高温アルカリ下（55℃、pH9.0-10.0）で至適生育を示し、セルロソームを介し高いセルラーゼ及び高ヘミセルラーゼ活性することから、主に繊維分解・可溶化の役割を担っており，*Tepidimicrobium* sp.は、有機酸資化能力が高いことから、*H. saccincola* の代謝産物の掃除役的働きをしていると考えられた。これらの結果から、上記の微生物集団はバイオマス可溶化に対し、それぞれ効果的役割を有していることが示唆された。

Herbivorax saccincola, Tepidimicrobium sp., Lignocellulose

講演番号：2A12a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A12 会場

非加熱・無殺菌米副産物からの光学活性乳酸の生成と SSF 中微生物菌叢構造との関連

Characteristics of fermentative L-(+)-lactic acid production from non-sterilized by-product of rice by LAB's and its relationship with formation of microbial consortia in SSF.

○渡辺 昌規[1]、山村 勇太[1]、牧野 将浩[2]、柏村 崇[2]、竹中 慎治[3]、塩野 忠彦[4]、佐々野 和雄[5]([1]山形大農、[2]（株）サタケ、[3]神大院農、[4]広島総技研・食工技セ、[5]食協（株））

○Masanori Watanabe[1], Yuta Yamamura[1], Masahiro Makino[2], Takashi Kashiwamura[2], Shinji Takenaka[3], Tadahiko Shiono[4], Kazuo Sasano[5] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci., Yamagata Univ., [2]Satake co.ltd., [3]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ., [4]Food Tech. Res., Hiroshima Pref. Tech. inst., [5]Shokkyo co. ltd.)

【目的・背景】洗米排水から新規に分離された米由来バイオマス資化性を有する高 L-乳酸生成乳酸菌 *L. rhamnosus* strain M-23 は、非加熱・無殺菌状態の洗米排水・米糠混合物を単一基質とした SSF（同時糖化発酵）により、高濃度且つ、高光学純度(95%以上)の L-乳酸を生成する。これまでに、分離菌株の生成乳酸濃度と SSF 発酵液中のプロテアーゼ活性値との間に高い相関性を有する事、米由来バイオマス中のデンプン粒子表層構造が培養初期段階からダイナミックに変化し、デンプンの結晶構造が露出する事を SEM、FT-IR 解析により見出し、分離菌株により産生されたプロテアーゼが SSF を促すリファイナリ機能を有していること明らかにしている。しかしながら、現在までに、当該非加熱・無殺菌バイオマス SSF 培養液中の微生物菌叢構造と乳酸生成・蓄積に与える影響については明らかとなっていない。そこで本研究では、末端標識制限酵素断片多型分析(T-RFLP)法による SSF 培養液中微生物叢構造解析を実施した。

【方法・結果】T-RFLP 法による微生物菌叢構造解析の結果、高 L-乳酸生成乳酸菌である M-23 株の SSF において、培養初期に *Clostridium*（属）クラスターIX、同 XIVa、*Bacteroides* 目から成る菌叢を形成し、その後、*Lactobacillales* 目によるドミナント形成（80%以上）が認められた。それに対し、低 L-乳酸生成乳酸菌は、培養初期に *Clostridium*（属）クラスターIX による菌叢形成と顕著なプロピオン酸生成と乳酸濃度の低下が認められた。このことは、SSF 培養液中の微生物叢構造が乳酸生成・蓄積に影響を与えていることを示唆しており、安定且つ、効率的な乳酸生成を可能にするためには、乳酸製造時における SSF 培養液中の微生物菌叢制御が重要であることを示唆した。

By-product of rice, Lactic acid bacteria, T-RFLP

発表責任者：渡辺昌規（mwata@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2A12a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A12 会場

多核固体 NMR によるコーヒー生豆および焙煎豆の細胞壁の構造解析

Multinuclear solid-state NMR characterization of cell wall structure in green and roasted coffee beans

○川村 出、金井 典子（横国大 理工）
○Izuru KAWAMURA, Noriko KANAI (Yokohama Natl. Univ.)

植物の細胞壁はバイオマス資源の利活用において注目されている[1]。コーヒー豆も双子葉植物に分類される植物から栽培され，その種子であるコーヒー生豆を焙煎し，焙煎豆としてコーヒー豆の細胞壁は主にセルロース，ガラクトマンナンやリグニンなどで構成され、コーヒー豆の乾燥重量の約 50%を多糖類，約 20%をリグニンが占め、機械的強度の高い構造を形成している[2,3]。コーヒー豆の世界年間生産量は 800 万トン以上あり，熱水で抽出後に残るコーヒー残渣においても細胞壁成分は残るため，食品廃棄物系バイオマス(食品加工残渣)の一つとして高度に再利用することは循環型社会構築のための一助になる。そのために細胞壁の高次構造情報は必要不可欠であるが，不溶性かつ非結晶性の部分を含むために構造解析が難しく，微量に含まれる元素の役割も完全にはわかっていない。本研究ではコーヒー豆の細胞壁構造を高度に理解するために，不溶性の試料であってもマジック角回転法(MAS)などによる高分解能技術によって構造解析が可能な固体NMR分光法を用いた構造解析を行う。具体的には，インドネシア産ロブスタ種のコーヒー生豆および焙煎豆 ^{1}H, ^{11}B, ^{13}C, ^{27}Al などを観測核とした多核固体 NMR 実験を行った。

^{1}H MAS NMR では，細胞内に閉じ込められている不飽和トリアシルグリセリドの信号を生豆と焙煎豆双方で観測した。また、生豆のみでセルロースなどに吸着していると思われる水の NMR 信号を観測した。^{13}C MAS NMR において，セルロース，ヘミセルロース，リグニン由来の信号を観測し，生豆と焙煎豆の間でスペクトルパターンに大きな差は見られなかった。また，一般に植物細胞壁に存在するペクチンを架橋するとされるホウ酸ジエステル結合の確認のために，^{11}B MAS NMR を用い、生豆と焙煎豆の双方で観測し，それらの信号にほとんど差はなかった。また，生豆の ^{27}Al MAS NMR 測定では,幅広い NMR 信号が観測され，焙煎豆においてその信号は大きく減少していた。Al に関しては焙煎過程においてコーヒー豆に微量の Al が存在する部位の構造変化が生じていることが示唆された。このような一連の固体 NMR 測定はユニークな研究であり，コーヒー豆の強固な細胞壁構造と一部の微量元素が焙煎後もその構造の構築に関与していることを明らかにした。発表では他の観測核による測定結果と合わせて，コーヒー豆の細胞壁の構造情報に関するより詳細な解析として報告したい。

[1] 横山隆亮，鳴川秀樹，工藤光子，西谷和彦（2015）*化学と生物* 53, 107.
[2] L.F. Ballesteros, et al. (2014) *Food Bioprocess Tech.* 7, 3493.
[3] 阪本龍司，尾崎嘉彦 (2014) *化学と生物* 52, 33.

solid-state NMR, cell wall, coffee bean

発表責任者：川村 出（izuruk@ynu.ac.jp）

講演番号：2A12a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A12 会場

発酵阻害物質を含むバイオマス糖化液を用いた乳酸発酵生産における阻害耐性株の効率的育種

Efficient engineering of fermentation inhibitor-resistant strains in lactic acid fermentation using biomass saccharified solution containing the inhibitors

○前田 貴行、山本 恭士、湯村 秀一、宮奥 康平（三菱ケミカル株式会社）
○Takayuki Maeda, Yasuhito Yamamoto, Shuuichi Yunomura, Kouhei Miyaoku (Mitsubishi Chemical Corp.)

【目的】

経済的なバイオコモディティー生産の実現を目指す上で、非可食資源由来原料の利用は大きく期待されるところである。しかしながら、こうした原料の前処理工程にて生成する物質により発酵生産の効率が著しく低下することが問題となっており、非可食由来原料を用いる発酵生産プロセスではこれらの物質による影響を低減する手法の開発が強く求められている。このため、本研究においてはサトウキビ搾汁後の残渣であるバガスの糖化液を原料とする有機酸生産を題材に、発酵阻害物質に耐性を有する微生物を効率よく育種する手法の開発に取り組んだ。

【方法と結果】

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 を用いて、バガス糖化液を基質とした発酵試験、および菌体内メタボローム解析を実施した。結果、発酵阻害物質を含むバガス糖化液を用いた条件では、対照区である試薬グルコースを用いた条件と比較して、中央代謝経路内の複数の代謝産物について蓄積量の低下が確認された。また、これらの条件で網羅的なプロテオームおよびトランスクリプトームを比較解析した結果、それらの代謝産物の生成反応を触媒する蛋白質の発現量および遺伝子転写量が低下していたことから、発酵阻害物質による影響はそれらの蛋白質の転写レベルでの阻害である可能性が示唆された。

そこで、上述の転写量が低下していた遺伝子について、それぞれ単独発現強化株を作製し、発酵試験を実施したところ、バガス糖化液の利用による発酵生産阻害は非増強株と比較して抑制されることを確認し、その割合（阻害回復率）は最大で 49.8%となった。次に、単独発現強化により阻害回復率が向上した遺伝子の内、上位 6 遺伝子を選抜して多重発現強化株を作製し、同様の発酵試験を実施したところ、単独発現強化株と比較してさらに阻害回復率が向上し、74.4%に達した。本研究の結果から、表現型解析→遺伝子設計→宿主への導入→評価といったゲノムデザインサイクル（GDC）の活用による微生物育種の有効性が実証された。

【謝辞】

本研究は経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の支援を受けて実施した。

Corynebacterium glutamicum, Biomass saccharified solution, Multi-omics analysis

発表責任者：前田貴行（maeda.takayuki.me@m-chemical.co.jp）

講演番号：2A12a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A12 会場

大型藻類主要多糖であるアルギン酸を直接資化する酵母の分子育種

Molecular breeding of yeast for direct bioethanol production from main macroalgae polysaccharide, alginate

○黒田 浩一[1]、高木 俊幸[1]、佐々木 勇輔[1,2]、元根 啓佑[1]、植田 充美[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・総合生存）
○Kouichi KURODA[1], Toshiyuki TAKAGI[1], Yusuke SASAKI[1,2], Keisuke MOTONE[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Integ. St.)

[背景・目的]

広大な排他的経済水域を持つ日本において、大型海藻は非常に有望なバイオマス資源である。陸上植物に特有なリグニンを含まないため、簡単な処理で多糖成分を抽出できる利点を有しているものの、海藻は陸上植物と多糖構成が異なるため、既存技術に基づく手法ではエタノールへの変換効率が低い。特に、アルギン酸は褐藻の乾燥重量の約 40%を占める主要多糖であるが、海洋細菌による資化機構もあまり分かっておらず、大型藻類の有効利用は進んでいない。本研究では、海藻資化能が極めて高い海洋細菌 *Saccharophagus degradans* に注目し、そのオミックス解析によりアルギン酸資化機構の解明を行うとともに、そのアルギン酸資化情報を基にした合成生物学的手法により、アルギン酸を直接エタノールに変換するアルギン酸資化酵母の分子育種を行った。

[方法・結果]

我々はこれまでに、海洋細菌 *S. degradans* をアルギン酸、グルコース、ペクチン存在下で培養し、その全タンパク質を抽出して比較プロテオーム解析を行い、アルギン酸分解時に時的に生産しているタンパク質を同定し、アルギン酸資化に関わる酵素群を明らかにしてきた[1]。また、*S. degradans* 由来のエンド/エキソ型アルギン酸リアーゼを細胞表層工学技術[2]によって酵母の細胞表層に提示することにより、多糖であるアルギン酸を分解して単糖 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid（単糖 DEH）に分解する酵母の構築にも成功してきた[3]。今回、酵母によりアルギン酸から直接エタノール発酵を行うため、上記のエンド/エキソ型アルギン酸リアーゼ共提示酵母に単糖 DEH の人工代謝経路を構成する酵素をコードする遺伝子群をゲノムに導入し、アルギン酸資化酵母の構築を試みた。エンド/エキソ型アルギン酸リアーゼを共提示し、かつ単糖 DEH 代謝経路酵素を発現する酵母をアルギン酸培地で継代培養したところ、アルギン酸資化能を増強した Alg1 株を育種できた。さらに細胞内のレドックスバランスを調整するため、Alg1 株にマンニトール資化能を付与したところ、アルギン酸から 1 種類の細胞で直接エタノールを発酵生産することに成功したのでまとめて報告する[4]。

[1] T. Takagi et al., *Mar. Biotechnol.*, 18, 15-23 (2016)
[2] K. Kuroda, M. Ueda, *Methods Mol. Biol.*, 1152, 137-155 (2014)
[3] T. Takagi, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 1723-1732 (2016)
[4] T. Takagi, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 6627-6636 (2017)

Brown macroalgae, Alginate, Yeast cell surface engineering

講演番号：2A12p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A12 会場

湿式ミリング処理木質バイオマススラリーからのメタン生成に及ぼす栄養源添加の効果
Effect of addition of nutrients on stable methane production from wet-milled woody biomass
糸永 誠[1]、松尾 健司[1]、ナバロ ロナルド[2]、金原 和秀[3]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、佐々木 慧[4]、田島 誉久[1]、加藤 純一[1]、○中島田 豊[1]([1]広島大院先端、[2]森林総合研究所、[3]静大院工、[4]広国院大工)
Makoto Itonaga[1], Kenji Matsuo[1], Ronald Navarro[2], Kazuhide Kimbara[3], Otsuka Yuichiro[2], Masaya Nakamura[2], Kei Sasaki[4], Takahisa Tajima[1], Junichi Kato[1], ○Yutaka Nakashimada[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Shizuoka Univ., [4]Hiroshima Hokusai Gakuin Univ.)

【目的】これまで、高温条件下で酸・アルカリ前処理し酵素糖化した木質バイオマスからのエタノールなど液体燃料生産法の開発が行われてきた。しかし、上記前処理ではフルフラールやリグニン由来の芳香族化合物生成による増殖阻害や、煩雑な分離工程でのエネルギー収支の悪化が懸念される。そこで我々は、分離工程を必要としないメタン発酵に着目、木質バイオマスを、温和な条件で金属ビーズ・酵素液と共に攪拌し、粉砕・糖分解を同時に行う湿式ミリング法を前処理プロセスとしたメタン発酵プロセスの開発を進めている。本研究では、メタン発酵に最適な湿式ミリング前処理条件の検討、および安定した連続メタン発酵を目的とする栄養源添加の効果を検討した。
【方法･結果】スギをモデル木質バイオマスとして、まず、メタン生成に最適なミリング処理時間、及び添加酵素量を検討した。処理時間、または酵素添加量を変えて製作した原料スラリーと高温メタン発酵汚泥を有機物比率 1:4 で混合し、55℃でメタン生成試験を行った。その結果、経済性、エネルギー収支を考慮した場合、処理時間 15～30 分、酵素量 5ml/500ml-原料スラリーでの前処理が適当と考えられた。そこで、処理時間 15～30 分、酵素量 5ml/500ml-原料スラリーを用いて、安定した連続メタン発酵における栄養源の添加効果を検討した。
栄養素として窒素源, 微量金属, およびビタミン類を組み合わせて添加した原料スラリーを用いて、水理学的滞留時間（HRT）を 30 日とする半連続メタン発酵試験を行った。十分定常状態に達した連続培養開始後 110 日におけるバイオガス生成量に大きな違いはなかったが、ガス組成は大きく変化した。栄養源無添加、および窒素源のみを添加した場合、CO_2 以外のガス成分の大部分は水素であった。窒素源+微量金属類、および窒素源+微量金属類+ビタミン類添加時には、メタンが主要ガス成分であった。この結果から、木質バイオマスのミリング原料からの安定したメタン生成には、窒素源および微量金属類の添加が重要であることが示唆された。しかし、窒素源+微量金属類+ビタミン類添加時においてもバイオガス中に 6%程度の割合で水素が検出された。これは、今回添加した栄養源のみでは完全に安定したメタン生成には、まだ不十分であることが示唆された。そこで、窒素源+微量金属類+ビタミン類に加えて比較的安価で豊富に手に入る複合栄養源であるドッグフードを添加したところ、残存水素を含まない安定したメタン生成を確認した。
本研究成果は、平成 27-28 年度福島県委託事業「メタン発酵による木質バイオマス活用実証事業」で得られたものである。

methane, woody biomass, wet-milling

発表責任者：中島田豊（nyutaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A12p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A12 会場

湿式ミリング処理法を用いた木質バイオマスの連続的メタン発酵プロセスの実証試験

Demonstration test of methane fermented process from wet-milled woody biomass

○松尾 健司[1]、糸永 誠[1]、ナバロ ロナルド[2]、金原 和秀[3]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、佐々木 慧[4]、藤村 治[4]、佐々木 健[4]、田島 誉久[1]、加藤 純一[1]、中島田 豊[1]（[1]広島大院先端物質、[2]森林総合研究所、[3]静岡大院総合科学技術、[4]広島国際学院大工）

○ Kenji MATSUO[1], Makoto ITONAGA[1], Ronald NAVARRO[2], Kazuhide KINBARA[3], Yuichiro OTSUKA[2], Masaya NAKAMURA[2], Kei SASAKI[4], Osamu FUJIMURA[4], Ken SASAKI[4], Takahisa TAJIMA[1], Junichi KATO[1], Yutaka NAKASHIMADA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Shizuoka Univ., [4]Hiroshima Kokusai Gakuin Univ.)

【目的】我々は、木質バイオマスを再生可能エネルギーとして活用するために、湿式ミリング法により前処理した木質バイオマスのメタン発酵プロセスを開発している。本研究では、福島県内に木質バイオマスをエネルギー資源として活用するための湿式ミリング-メタン発酵実証プラントを設置し、安定した連続メタン発酵条件の検討、および様々な木質バイオマスを原料とした発酵試験を行い、今後の実用化に向けた基礎データを収集した。

【方法･結果】

福島県内に設置した実証施設において、水処理施設より供与された高温嫌気消化汚泥を微生物源として、容量 500L の発酵タンクを用いた連続メタン発酵処理を行った。約 180L の嫌気消化汚泥に湿式ミリング法で処理したスギ心材スラリーを逐次投入することなどにより馴養を行った。スラリーの投入を始めて発酵液容積が 300L に達した時点で、1 日当たり 1kg を処理したスラリー約 10kg を投入してメタン発酵を行う、水理学的滞留時間（HRT）30 日の連続運用に移行した。ここで、ラボ試験での成果を基に窒素源、微量金属を添加した。

連続発酵試験以降、バイオガスのメタン濃度は 50%～65%を継続的に記録した。しかし、徐々に pH が低下し、連続発酵試験後 2 ヶ月半程経過した時点で、pH が急激に低下するとともに、有機酸が顕著に蓄積した。本結果から、試薬のみによる栄養源の添加では、安定したメタン生成には不十分であると判断した。そこで、補助栄養剤として無機添加剤に加えドッグフードを添加したところ、4 ヶ月間にわたりメタン生成に成功したことから、木質スラリーの安定したメタン発酵には、複雑な栄養要求性を解決する必要があることが分かった。

そこで、ミリングスラリーに対して無機添加剤とドッグフードを加えた条件を標準として、福島県内で採取したスギ心材やバーク、アカマツ、コナラ、そしてこれら複数樹種の混合物を原料とする連続メタン発酵試験を行った。その結果、いずれの原料においても、良好で安定したメタン発酵を安定して継続できた。このことから、湿式ミリング処理は、福島県内で主に発生する木質のバイオマス資源について、広範に処理が可能なシステムとして期待することを示すことができた。

本研究成果は、平成 27-28 年度福島県 委託事業「メタン発酵による木質バイオマス活用実証事業」で得られたものである。

methane, woody, wet-milling

講演番号：2A12p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A12 会場

Microbial community dynamics during anaerobic digestion of SESC-treated woody biomass

○Ronald Navarro[1], Yuichiro Otsuka[1], Masaya Nakamura[1], Tomoyuki Hori[2], Hiroshi Habe[2], Kenji Matsuo[3], Kei Sasaki[4], Ken Sasaki[4], Kazuhide Kimbara[5], Yutaka Nakashimada[3], Junichi Kato[3]
([1]Forestry and Forest Products Research Institute, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [3]Hiroshima University, [4]Hiroshima Kokusai Gakuin University, [5]Shizuoka University)

[Objective] The methanogenic microbial community during anaerobic digestion of various pre-treated wood biomass was investigated. As a new approach to wood pre-treatment, the simultaneous enzymatic saccharification and comminution (SESC) process was employed.
[Methodology] Ten per cent aqueous mixture of wood powder (48 μm particle size) from various species, i.e., cedar, elm, oak and red pine heartwood, was subjected to beads milling in the presence of cellulase and hemicellulase to achieve a median particle size of 1μm. For anaerobic digestion, 10 kg of the 10% wood slurry enriched with vitamins, nitrogen, trace elements and dog food were fed daily to a continuous stirred-tank reactor containing around 300 L of thermophilic methanogenic sludge collected from a sewage plant. Ten kg of the sludge was also withdrawn daily to achieve a hydraulic residence time (HRT) of 30 days. The wood slurry and sludge samples were subjected to chemical and microbial analysis using the Illumina platform, respectively.
[Results and Discussion] Wood pre-treatment achieved 60% saccharification efficiency based on the cellulose content. During anaerobic digestion, an average yield of 240 L methane per kg wood was attained. High-throughput Illumina sequencing of 16S rRNA genes clarified the relevant microorganism for the process. The methanogenic microbial community was dominated by the species, such as *Defluviitoga tunisiensis, Coprothermobacter proteolyticus, Anaerobaculum hydrogeniformans* and *Methanothermobacter crinale*. There was a clear transition of the original microbial community from a protein- (represented by *C. proteolyticus*) to a polysaccharide-hydrolysing (represented by *D. tunisiensis*) type. *A. hydrogeniformans* and *M. crinale* were the major hydrogen-producing bacterium and methanogenic archaeon, respectively. The predominance of *M. crinale* indicates that the anaerobic digestion is mediated via syntrophic acetate oxidation coupled with hydrogenotrophic methanogenesis. The relative abundance of this archaea was kept below 5% during the amendment with heartwood slurry but it dramatically increased upon the introduction of a cedar bark slurry as substrate, reaching almost 30% of the total microbial population two weeks after its addition. During this period, methane production remained stable. These results indicate the capability of SESC process to render lignocellulosic polysaccharides readily available to anaerobic digestion, catalyzed by a combination of syntrophic acetate oxidation and hydrogenotrophic methanogenesis.

This work was supported by the Fukushima prefecture project (2016-2017) entitled ‘Utilization of woody biomass for methane fermentation.’

microbial community, methane fermentation, lignocellulose

発表責任者：Otsuka Yuichiro（yotuka@ffpri.affrc.go.jp）

講演番号：2A12p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A12 会場

固定化光合成細菌ビーズを用いた木質バイオマス糖化液のメタン発酵消化液の浄化処理

Purification of methan fermentation digested waste from milled woody biomass using immobilized photosynthetic bacteria beads

○佐々木 慧[1]、中村 薫[1]、藤村 治[1]、松尾 健司[2]、ナバロ ロナルド[3]、中島田 豊[2]、金原 和秀[4]、大塚 祐一郎[3]、中村 雅哉[3]、加藤 純一[2]、佐々木 健[1] ([1]広国院大工、[2]広大院先端、[3]森林総合研究所、[4]静大院工)

○ Kei SASAKI[1], Kaoru NAKAMURA[1], Osamu FUJIMURA[1], Kenji MATSUO[2], Ronald NAVARRO[3], Yutaka NAKASHIMADA[2], Kazuhide KIMBARA[4], Yuichirou OOTSUKA[3], Masaya NAKAMURA[3], Jyunichi KATOU[2], Ken SASAKI[1] ([1]Hiroshima Kokusai Gakuin Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]Forest and Forest Products Research Institute, [4]Shizuoka Univ.)

【目的】

我々は木質バイオマスを湿式ミリングにより糖化させ、その糖化液をメタン発酵させることでエネルギー資源とする技術を開発している。また、福島県内に木材を湿式ミリング後にメタン発酵させる実証プラントを設置し運転を行った。この度はこのプラントの運転過程で生じるメタン発酵消化液を、光合成細菌を固定化したビーズ（SSI ビーズ）を用いて浄化を行った。これまでに我々は実験室規模（処理液量 7L 以下）の試験で SSI ビーズを用いて廃水中の様々な重金属（Cu、Al、Ag、Pb、Cd、Cr、Cs など)、及び放射能の除去を報告している。これは SSI ビーズによるプラント規模の廃水浄化処理の初の報告である。SSI ビーズの製造条件、及び浄化処理条件を検討し、更なるスケールアップ、及び実用化に資するデータを収集した。

【方法と結果】

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* SSI 株は水中の重金属を吸着除去する性質がある。この菌体をアルギン酸 Na で固定化し、直径約 1cm の球状に成型した。菌体は 90L の培養タンク（丸菱 BEM 社製）を用い、好気暗条件で培養を行った。またビーズの成型には新規に開発した自動成型装置を用いた。これらの装置で生産した SSI ビーズは従来の実験室規模の嫌気明条件で生産した SSI ビーズと遜色のない浄化活性を示した。

メタン発酵消化液を遠心分離した上清の凝集沈殿処理のため、様々な条件で凝集沈殿試験を行った。試験にはカチオマー300 とサンフロック C-900P（三洋化成工業社製)、フジクリーン KT-250（富士エンジニアリング社製)、及び焼きミョウバンを用いた。その結果、メタン発酵消化液上清ではフジクリーン KT-250 を pH5.5 以下の条件で用いた際に顕著な凝集沈殿を示した。

浄化処理には 70L 規模のエアリフト式浄化ユニットにかごに詰めた SSI ビーズを投入して処理を行ったが、メタン発酵消化液上清ではビーズが崩壊する問題が生じた。ビーズ崩壊の抑制のため、ビーズ製造条件の検討、内部循環式浄化ユニットの投入、浄化処理条件の検討などを行った。その結果、SSI ビーズを浄化ユニットと塩化Ca溶液に交互に漬けて使用することでアルギン酸ビーズの崩壊を抑制し、継続的に浄化処理を行うことができた。実験室規模の試験と同様に COD の低減を確認した。

本研究成果は、平成 27-28 年度福島県 委託事業「メタン発酵による木質バイオマス活用実証事業」で得られたものである。

woody biomass, methan fermentation digested waste, immobilized photosynthetic bacteria beads

発表責任者：佐々木慧（j.sasaki@hkg.ac.jp）

講演番号：2A12p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A12 会場

水田での高効率なバイオメタン生産法(GET システム）の確立に関する研究

GET system: Self-sufficient renewable energy production system in paddy field

○柴田 康平、森下 創太、陳 韶華、大場 正春、平野 達也、村野 宏達、林 義明、前林 正弘、片山好春、田村 廣人 (名城大農)
○ Kouhei SHIBTA, Souta MORISHITA, Shaohua CHEN, Masaharu OHBA, Tatuya HIRANO, Hirotatu MURANO, Yoshiaki HAYASHI, Masahiro MAEBAYASHI, Yoshiharu KATAYAMA, Hiroto TAMURA (Meijo Univ.)

【背景と目的】メタンは温室効果ガスの一つであり、単位質量当たり二酸化炭素の約 25 倍の温室効果をもつ。また、我国のメタン発生量の約 45%は、水田を起源としている。一方、メタンは天然ガスの主成分であり、重要なエネルギー資源である。そこで、我々は、水田からのメタン発生の抑制という発想を転換し、湛水田に稲わらを施与し積極的にメタンガス（G）をエネルギー（E）として田んぼ（T）から回収（GET）する「GET システム」を構築した。「GET システム」は建設コストが低く、運営維持が容易であり、基質である稲わらを毎年供給し、放置水田をエネルギー生産の場にすることが可能である。これまでの研究で、施与する稲わらの量および大きさについて最適化が行われた。本研究では、より高効率でバイオメタンを生産するため、稲わらの施与法について検討したのでその結果を報告する。

【材料と方法】名城大学附属農場の水田に、縦 4.5 m、横 0.8 m、高さ 0.2 m の畝を 9 つ作製した。裁断した稲わらを施与しない無処理区（Type 1）、5～10 cm に裁断した稲わら 90 kg を 45 kg ずつ 2 回に分けて施与する分割施与区 (Type 2)、稲わら 90 kg を一度に施与する単回施与区 (Type 3)をそれぞれランダムに３反復ずつ設けた。畝を厚さ 1 mm の黒色シートで被覆し、水田を湛水した。ガス回収量、メタン濃度、温度、酸化還元電位、土壌中の有機酸生成量を測定した。異なる試験区のバイオメタン生産量を比較するため、稲わらに含まれる炭素量を基準とした回収率を算出した。

【結果】Type 2 において試験開始 19 日目に追加施与前最大となる 196 L/日のバイオガスが発生したが、追加施与後 6 日目に 230 L/日のバイオガスが発生した。また、Type 2 では稲わら 45 kg の追加施与後に最大 327 L/日のバイオガスが発生した。Type 3 においては最大 233 L/日のバイオガスが発生した。試験期間中に施与した稲わらに含まれる炭素を基にした回収率は、Type 2 で 37.5% 、Type 3 で 28.9%だった。

biomethane, renewable energy, paddy field

講演番号：2A12p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A12 会場

比較トランスクリプトーム解析による *Pseudomonas* 属細菌由来レブリン酸代謝系酵素遺伝子の取得と機能解析

Isolation and characterization of the gene involved in levulinic acid metabolism of *Pseudomonas* sp. by comparative transcriptome analysis

○羽部 浩[1]、小池 英明[2]、佐藤 由也[1]、飯村 洋介[1]、稲葉 知大[1]、堀 知行[1]、菅野 学[2]、木村 信忠[2]、桐村 光太郎[3] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロセス、[3]早大・先進理工)
○ Hiroshi HABE[1], Hideaki KOIKE[2], Yuya SATO[1], Yousuke IIMURA[1], Tomohiro INABA[1], Tomoyuki HORI[1], Manabu KANNO[2], Nobutada KIMURA[2], Kohtaro KIRIMURA[3] ([1]EMRI, AIST, [2]BPRI, AIST, [3]Waseda Univ.)

【背景・目的】近年産総研により、木質バイオマスをレブリン酸（LA）へと 1 段階で変換できる、水系でも利用可能な Lewis 酸／Brønsted 酸のハイブリッド酸触媒が開発された。この $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ と H_3PO_4 から成るハイブリッド酸触媒により、杉木粉から対セルロース収率 86%で LA が合成できる [1)]。GFBiochemicals 社は、別の酸系触媒を使ってバイオマス由来 LA を商用スケールで生産しており、2017 年までにイタリアで年産 10,000 トン規模までスケールアップしている。今後 LA が安価かつ大量に提供できる可能性が示されれば、糖以外のリグノセルロース由来基幹物質として LA も注目される。もし LA を基質としたバイオ変換により，従来の糖プラットフォームや LA の化学触媒反応では製造が難しい化学品が製造可能となれば、リグノセルロース利用法の多様性が拡充され、バイオマスをより効率的に利用することが可能となる。

【実験・結果】*Pseudomonas* sp. LA18T 株 [2)]における LA 代謝系を解明するため、LA 生育時に高発現する遺伝子の特定を試みた。最初に LA18T 株の遺伝情報を取得するため、ドラフトゲノム解析を行った。これらゲノム情報に基づき、RNA-seq 法による比較トランスクリプトーム解析を行った。各菌株を LA およびピルビン酸を基質とした培地で培養し、対数増殖中期の菌体から、キットを用いて RNA を精製した。続いて、キットにより cDNA ライブラリーを調製した後、MiSeq（イルミナ）を用いてシークエンスを行った。発現量の解析は、低クオリティのシークエンスを Trimmomatic v0.30 等によって除去した後、発現強度を正規化することで行った。

LA18T 株での解析の結果、ピルビン酸生育時と比較し、LA 生育時に発現量が 5 倍以上になる遺伝子を含むゲノム領域が取得された。このゲノム領域には、輸送タンパク質およびアシル CoA リガーゼと相同性のある遺伝子がクラスターを成して存在しており、それぞれ 5 倍、7 倍の発現量増加（対ピルビン酸生育時）を示した。さらに，ホスホグリセリン酸ムターゼ、短鎖型脱水素酵素、アシル CoA 脱水素酵素等と相同性のある遺伝子群もクラスターを成して存在しており、それぞれ 5 から 10 倍の発現量増加（対ピルビン酸生育時）を示した。このうち、アシル CoA リガーゼと相同性のある遺伝子を pCold ベクター（タカラ）に連結したプラスミドで大腸菌 JM109 株を形質転換し、各種条件検討の後、SDS-PAGE によりタンパク発現を確認した。推定基質である LA を含むリン酸バッファーを用いて粗酵素反応を行ったところ、経時的にレブリニル CoA の増加が確認された。1)Nemoto *et al.* (2015) Bull. Chem. Soc. Jpn. 88: 1752、2)Habe *et al.* (2015) Bioresour. Technol. 177: 381.

levulinic acid, cellulosic biomass, microbial conversion

講演番号：2A12p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A12 会場

膜利用発酵リアクターによるエタノール収量向上メカニズムの解明

Elucidation of the ethanol yield improvement mechanism with the use of membrane integrated fermentation reactor

○井手 深雪、耳塚 孝、須田 和美、日笠 雅史、山田 勝成（東レ株式会社）
○Miyuki IDE, Takashi MIMITSUKA, Kazumi SUDA, Masashi HIGASA, Katsushige YAMADA (TORAY)

【目的】現代は、化石原料を消費する資源消費型社会と言われているが、化石原料が有限であること、GHG 排出量が増大していることを背景に、再生可能なバイオマス資源を活用する循環型社会へのパラダイムシフトが必要と言われている。当社では再生可能なバイオマスからの化学品製造プロセスを研究開発しており、特に廃糖蜜からのバイオエタノール製造に着目し研究開発を進めている。具体的には、発酵槽に当社ＭＦ膜を接続した MFR(Membrane integrated Fermentation Reactor)を用いた菌体リサイクル型連続発酵技術（MFR 発酵）を研究開発している。本プロセスは、発酵液をろ過することで微生物を発酵槽内に高い濃度で保持し続け、生産速度を従来の２から５倍に向上できるプロセスである。

本プロセスを廃糖蜜からのバイオエタノール連続発酵に適用したところ、従来技術であるバッチ発酵に対してエタノール収量が大幅に向上することを見出した。しかも廃糖蜜に含有されている可食糖からの理論収率を超えたエタノール収量が得られており、エタノール収量向上メカニズムの解明が必要であった。

そこで当社では、エタノール収量向上メカニズムの解明に取り組んでいる。

【方法】全遺伝子の転写量は、バッチ発酵、MFR 発酵で得られた RNA を RNA シークエンス解析することで分析した。

【結果】培養中の転写 RNA 総数は 12,000 あった。転写 RNA のうち、MFR フェーズに特徴的な RNA が 143 遺伝子(MFR フェーズでのみ転写される RNA：50 遺伝子、MFR フェーズでのみ転写されない RNA：93 遺伝子)あった。本発表ではこれら 143 遺伝子からエタノール収量向上メカニズムに関与すると考えられる遺伝子に着目し、エタノール収量向上メカニズムの解明に取り組んだ結果について一部を発表する。

molasses, bioethanol, continuous fermentation

講演番号：2A12p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A12 会場

バイオマス変換用途向け膜プロセス開発

Development of membrane separation process for biomass conversion technology

○畠平 智子、志村 芙美、志村 俊、小林 敦、武内 紀浩、耳塚 孝、木村 将弘（東レ（株））
○Satoko HATAHIRA, Fumi SHIMURA, Shun SHIMURA, Atsushi KOBAYASHI, Norihiro TAKEUCHI, Takashi MIMITSUKA, Masahiro KIMURA (Toray Industries, Inc.)

［背景・目的］当社は長年培ってきた高分子技術、独自のナノテクノロジーにより、逆浸透（RO）膜、ナノろ過（NF）膜、限外ろ過（UF）膜、精密ろ過（MF）膜を水処理用途向けに開発してきた。これらの各種高分子膜について、昨今活発化しているバイオ燃料や植物由来バイオポリマー生産等、バイオマス変換用途への新規展開を目指しており、その一つとして、分離膜を用いた連続発酵法「膜利用連続発酵プロセス」の開発を進めている。これは発酵液を分離膜でろ過し、菌体を発酵槽に還流させてリサイクルしながら発酵を行う技術であり、通常のバッチ発酵法に比較して、プロセスの稼働率が向上するとともに、菌体が濃縮されることによる生産性の向上効果が得られる。当社ではこれまで、本プロセスを適用した実例として、D-乳酸連続発酵において 700 時間以上の長期安定運転を実現しており、バッチ発酵法に対して 7.5 倍の生産速度を得ている。一方で、長期運転時の膜ファウリングは依然課題であり、膜間差圧の上昇を抑制しながら連続発酵を可能とする運転方法が求められていた。そこで、膜利用連続発酵において、膜ファウラントの物理洗浄を効果的に適用することで膜間差圧の上昇を抑制することを目的とし、ラボレベルでの試験を実施した。
［実験方法］当社の高強度・低ファウリング PVDF 製中空糸膜を適用した膜利用連続発酵ラボリアクター（培養槽容量：1L）を作製した。発酵対象は D-乳酸連続発酵とし、アメリカカブトガニ由来の D-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母を用いた。長期連続発酵を実現する運転方法として、膜ファウリング物質を除去する逆圧洗浄、及びエアスクラビングの適用を検討した。両洗浄方法は水処理用途においても適用される手法ではあるが、乳酸発酵では微好気環境を維持する必要があるため、エアスクラビングにおいては酸素供給量の制御が必要である。そこで、使用した遺伝子組換え酵母の至適酸素移動速度定数 *kLa* を指標として培養槽へのエア通気量等運転条件を決定し、常時エアスクラビングを実施し効果を検証した。
［結果と考察］460 時間の連続乳酸発酵において、良好な乳酸収率及び乳酸蓄積濃度を得ると共に、種々連続発酵期間を複数のフェーズに分け、異なる条件にて逆圧洗浄、及びエアスクラビングを実施した結果、特に両洗浄方法を併用することで高い洗浄効果が得られ、長時間安定運転が可能になることを見出した。さらなる膜ファウリング抑制に向け、膜の閉塞メカニズム解析を進めている。

membrane, fouling, microbe

講演番号：2A12p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A12 会場

ヨシを用いたバイオエタノール生産における最適糖化酵素の検討

Examination of optimal saccharification enzyme in bioethanol production using reeds

○大石 孝太、高品 知典（東洋大院・生命科学）
○Kota OHISHI, Tomonori TAKASHINA (Grad. Sch. Toyo Univ.)

【背景・目的】近年、再生可能な新しいエネルギーの 1 つとして、バイオエタノールなどのバイオ燃料が注目されている。現在実用化されている第 1 世代バイオエタノールは、トウモロコシなどの可食部分を原料としているため、食糧需要と競合し、価格高騰を引き起こしてしまう問題を有している。そこで、新たに注目されているのが、食糧需要と競合が起きないリグノセルロース系バイオマスを原料とした第 2 世代バイオエタノールである。渡良瀬遊水地にはイネ科ヨシ属の大型の多年草であるヨシが群生しており、ヨシズ以外には有効利用されずに焼却処分されている。ヨシはリグノセルロース系バイオマスであることから、第 2 世代バイオエタノールの原料として利用可能ではないかと考えた。そこで、ヨシを用いてバイオエタノールを効率的に生産することを最終目標とし、本研究ではヨシを用いたバイオエタノール生産における最適糖化酵素の検討を行った。
【実験方法・結果】50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.2)に破砕乾燥ヨシと複合セルラーゼ 6 種(“ONOZUKA”R-10、“ONOZUKA” RS、スクラーゼ C、スクラーゼ X、アクレモニウムセルラーゼ、メイセラーゼ)を加えて 48 時間の酵素糖化を行った。その結果、還元糖・グルコース濃度増加量が最も多いのはスクラーゼ X であった。次に、複合セルラーゼ 6 種を作用させて得られた酵素糖化液を *E. coli* ATCC 55124 を用いてエタノール発酵することにより、*E. coli* ATCC 55124 のエタノール発酵に適した糖化酵素を検討した。その結果、エタノール濃度が最も高く、ヨシ 1 kg あたりのエタノール生産量が多いのは“ONOZUKA”RS であり、エタノール収率が最も高いのは“ONOZUKA”R-10 であった。また、糖化液の比率を増やした場合でも同様の結果が得られた。次に、初期還元糖濃度を一定にしたエタノール発酵を行った。その結果、各複合セルラーゼにおいてエタノール濃度に大きな差が確認できなかった。しかし、エタノール収率が高いのは“ONOZUKA”R-10、スクラーゼ X であった。また、ヨシ 1 kg あたりのエタノール生産量が高いのは“ONOZUKA”RS であった。一方、スクラーゼ C 及びスクラーゼ X おいては還元糖が同じ条件で完全に消費されていなかった。そこで、熱水処理をした乾燥破砕ヨシをスクラーゼ C 及びスクラーゼ X を用いて酵素糖化し、その酵素糖化液を用いたエタノール発酵を行った。その結果、未処理の乾燥破砕ヨシと比較して熱水処理を行った乾燥破砕ヨシを用いたエタノール発酵においてエタノール濃度、エタノール収率及びヨシ 1 kg あたりのエタノール生産量が高くなったことが確認できた。これらの結果をまとめて報告する。

Reed, Bioethanol, Recombinant E.coli

講演番号：2A12p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A12 会場

異なる種菌による複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物生産
Production of value-added substance in meta-fermentation using mixed culture systems with different inoculums

○田代 幸寛[1]、石田 勇貴[1]、木村 知弘[1]、奥川 友紀[1]、宮本 浩邦[2,3]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・農、[2]千葉大・園芸、[3]サーマス)
○Yukihiro TASHIRO[1], Yuki Ishida[1], Tomohiro Kimura[1], Yuki Okugawa[1], Hirokuni Miyamoto[2,3], Kenji Sakai[1] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., [2]Fac. Horticul., Chiba Univ., [3]Sermas)

我々は、複合微生物系による未利用資源からの有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱している[1)]。単一微生物が資化できない複合基質（廃棄物など）を複合微生物系では資化できる、殺菌が不必要、雑菌混入に対して強い、設備やエネルギーコストが低いなどがメリットに挙げられる。しかしながら、デメリットとしては、単一基質の変換が非効率的、生成物が複雑（ヘテロ発酵となりやすい）、微生物解析が複雑、発酵制御が困難、などがある[2)]。単一微生物を用いた純粋発酵に比べて、メタ発酵における理論の体系化や制御技術に関する知見は著しく少ない。これまでに、堆肥を種菌とした生ゴミからのメタ発酵において、発酵温度制御による L-乳酸生産の高光学純度化[3)]および新規な pH 切替制御法による L-乳酸生産の高速化[4)]に成功している。本研究では、異なる種菌がメタ発酵におよぼす影響を検討した。

従来の堆肥 A（原料：未利用海洋資源）[3,4)]に加えて、異なる原料・製法で製造された 2 種類の堆肥 B（原料：下水汚泥）と堆肥 C（原料：食品廃棄物）をメタ発酵の種菌を用いた。糖化処理した未殺菌標準生ゴミ培地にて、pH を 24 h 毎に 7.0 に振動制御しながら、温度 30ºC-65ºC でメタ発酵を行った。また、PCR- DGGE 法で各メタ発酵における細菌群集構造を解析した。堆肥 A を用いた場合、L-乳酸生産濃度は 50 ºC が最大であった。30 ºC から 45 ºC にかけて D-乳酸の蓄積がみられたが、50 ºC 以上からは D-乳酸の蓄積は見られなくなり、L-乳酸光学純度は 100%であった。堆肥 B を用いた場合、L-乳酸生産濃度は 45ºC が最大で、3 種類の堆肥種菌の中でも最高の値であった。低温でみられた D-乳酸の蓄積は 45ºC 以上でなくなり、L-乳酸光学純度は 100%であった。堆肥 C を用いた場合に、L-乳酸生産量は 50ºC が最大であった。30ºC から 45ºC にかけては D-乳酸の蓄積がみられたが、50ºC 以上からは D-乳酸の蓄積は見られなくなり、L-乳酸光学純度は 100%であった。いずれの種菌を用いた場合にも、45-55ºC におけるメジャーな DGGE バンドは *Bacillus coagulans* に帰属された。以上、いずれの堆肥を用いた場合でも高光学純度の L-乳酸生産が得られた温度における主要菌は L-乳酸生産菌として知られる *Bacillus coagulans* であり、異なる種菌を用いた場合でも主要菌となると考えられた。現在、自家発熱型高温好気消化液（原料：ヒトし尿）[5)]を種菌として用いたメタ発酵を実施している。

(1) 田代、酒井, バイオインダストリー, 72, 486-487, 2014. 2) 田代、酒井, 環境バイオテクノロジー, 16, 11-15, 2016. (3) Tashiro et al., Bioresour. Technol., 146, 672-681, 2013. (3) Tashiro et al., Bioreour. Technol., 216, 52–59, 2016. (5) Tashiro et al., in revision.

meta-fermentation, optically pure L-lactic acid, inoculum

発表責任者：田代幸寛（tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A12p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A12 会場

単細胞紅藻シゾンにおけるグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ過剰発現によるトリアシルグリセロール蓄積機構の解析

Regulatory mechanism of triacylglycerol accumulation by an overexpression of the glycerol-3-phosphate acyltransferase in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

○福田 智、平澤 英里、田中 寛、今村 壮輔（東工大 化生研）
○Satoshi FUKUDA, Eri HIRASAWA, Kan TANAKA, Sousuke IMAMURA (Tokyo Tech)

現在、世界のエネルギー需要のほとんどは化石燃料によってまかなわれている。しかしながら、化石燃料は有限の資源であり、その利用は地球温暖化を加速するなどの問題点がある。そのため、持続可能なバイオ燃料への注目が集まっている。そのなかでも、細胞内にバイオディーゼルの原料となるトリアシルグリセロール(TAG)を高蓄積する微細藻類は、バイオマス生産性が高く、食糧生産と競合しないことなどの利点のため、化石燃料に代わるエネルギー源として期待されている。しかしながら、微細藻類における TAG 蓄積の制御メカニズムは不明な点が多い。

小胞体上で行われる TAG 生合成の最初の反応は、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(GPAT)により触媒される。単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*（シゾン)を用いた当研究室の先行研究により、小胞体局在 GPAT1 を過剰発現させることで、TAG の蓄積量が乾燥重量あたり 10 倍以上に増加することが明らかになっている。GPAT が小胞体上で触媒する反応は、TAG のみならず、リン脂質などのグリセロ脂質生合成の最初の段階でもある。そして、TAG の生合成には、新規合成されたアシル基に加えて、リン脂質などのグリセロ脂質に含まれるアシル基が再利用されることが知られている。よって本研究では、TAG、リン脂質、GPAT の基質である遊離脂肪酸の量と組成を測定することにより、GPAT1 過剰発現株における TAG 高蓄積機構の解明を目的にした。

シゾンにおいて GPAT1 を過剰発現させたところ、先行研究と同様に TAG の蓄積とそれに含まれる 18:2 脂肪酸量の増加が観察された。そこで、GPAT の基質となる 18:2 脂肪酸量が増えているのではと考え、遊離脂肪酸の定量を行った。その結果、GPAT1 過剰発現株において、遊離脂肪酸の量は細胞あたり約 10 倍増加していたものの、その組成には大きな変化は観察されなかった。一方、GPAT1 過剰発現株におけるリン脂質を定量したところ、PC、PE、PI の量が細胞あたり約 2 倍増加しており、その組成は 18:1 脂肪酸が減少、18:2 脂肪酸が増加し、その他の脂肪酸は変化していなかった。この結果は、GPAT1 によってリン脂質に取り込まれた 18:1 脂肪酸が、リン脂質を基質とする不飽和化酵素によって不飽和化され、18:2 脂肪酸が生成されたことを示唆している。これらの結果から、GPAT1 過剰発現株における TAG の高蓄積は、増加したリン脂質由来の 18:2 脂肪酸が TAG の生合成経路に再利用されることが一因であると考えられる。

glycerol-3-phosphate acyltransferase, microalgae, triacylglycerol

発表責任者：今村　壮輔（simamura@res.titech.ac.jp）

講演番号：2A12p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A12 会場

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるトリアシルグリセロール生合成に関わる遺伝子の発現制御メカニズムの解析

Transcriptional regulation of triacylglycerol synthesis genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

○高橋 颯太、瀧 景子、河瀬 泰子、福田 智、田中 寛、今村 壮輔（東工大 化生研）
○Sota Takahashi, Keiko Taki, Yasuko Kawase, Satoshi Fukuda, Kan Tanaka, Sousuke Imamura (Tokyo Tech)

【研究背景】

化石燃料の利用は、地球温暖化の主原因である CO_2 を大気中に放出する。この放出量は、森林や海などが吸収できる CO_2 量を超過しているため、大気中の CO_2 量は年々増加している 。これにより、地球規模での気候変動が引き起こされ問題となっている。この問題の解決策の一つとして、再生可能エネルギーの利用が注目されている。微細藻類を用いたバイオ燃料生産は、再生可能エネルギーの 1 つであり、バイオ燃料の原料となるトリアシルグリセロール(TAG)などの中性脂質の生産性が高いことから特に有望視されている。しかしながら微細藻類において、様々なストレス条件に応じて引き起こされる TAG 生合成の制御機構には不明な点が多い。この機構を明らかにすることは、高効率なバイオ燃料生産を実現するために必要不可欠である。

【研究目的】

当研究室の先行研究において、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*（シゾン）における TAG 蓄積は、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (GPAT)の 1 つである、小胞体局在型 GPAT1 の転写産物量の増加により促進されることが明らかになっている。このことから、GPAT1 は TAG 生合成において枢要な役割を担っていることが考えられている。しかしながら、TAG 蓄積条件下における GPAT1 の転写制御機構は不明である。よって本研究では、GPAT1 の転写制御メカニズムを明らかにすることを目的にした。

【研究方法・結果】

GPAT1 の転写量を簡便に測定するため、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ系を構築して、その転写量の変動を解析した。その結果、窒素欠乏条件下では GPAT1 転写量は 24 時間以降から増加することが確認された。この発現パターンは、同条件下での TAG 蓄積パターンと同じ傾向を示した。このことから、窒素欠乏条件下では、GPAT1 の転写量の増加が TAG 蓄積の促進に寄与していることが考えられた。一方、リン欠乏条件においては、TAG 蓄積が確認されるものの、GPAT1 転写量の増加は認められなかった。これらの結果は、シゾン細胞ではストレスの種類に応じて異なる TAG 生合成経路が選択的に活性化されていることを示している。また、TAG 蓄積に正に寄与する転写因子を同定し、それらの TAG 生合成制御における役割についても解析を行ったので、合わせて報告する。

Cyanidioschyzon merolae, Triacylglycerol (TAG), Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)

発表責任者：高橋颯太（takahashi.s.bk@m.titech.ac.jp）

講演番号：2A12p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A12 会場

ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を利用した Milking 方式によるバイオ燃料生産の生産性向上

Improvement of free fatty acid prodution via milking using cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

○加藤 明宏[1,4]、高谷 信之[1,4]、池田 和貴[2,4]、愛知 真木子[3,4]、前田 真一[1,4]、小俣 達男[1,4]（[1]名大・院・生命農、[2]理研・IMS、[3]中部大・応用生物、[4]JST MIRAI）
○Akihiro KATO[1,4], Nobuyuki TAKATANI[1,4], Kazutaka IKEDA[2,4], Makiko AICHI[3,4], Shin-ichi MAEDA[1,4], Tatsuo OMATA[1,4] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Lab, for Metabolomics, RIKEN center for Integr, Med. Sci., [3]Col. of Biosci. and Biotech., Chubu Univ., [4]JST MIRAI)

［背景］

Milking 方式とは、生産物を継続的に細胞外に放出させて回収する生産方法のことを意味しており、生産コストの低減を可能とする。原核藻類であるラン藻は、遺伝子操作によって遊離脂肪酸（FFA）を細胞外へと放出するため、Milking 方式によるバイオ燃料生産の有力なホストとして期待されている。しかしながら、先行研究で報告されているラン藻の FFA 生産性は実用化に必要とされている値の 10 分の 1 程度であり、生産性の大幅な向上が必要とされている（Liu et al. 2011）。我々は、モデルラン藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 から FFA 放出株を作製し、その生産性の向上に取り組んでいる。実用化に向けた目標数値として、FFA の放出速度は 3 mg L^{-1} h^{-1}、細胞乾燥重量あたりの FFA 生産量は 4 g FFA g^{-1}DCW を設定した。

［結果］

野生株由来の FFA 生産株（dAS1T）の FFA 放出速度はわずか 0.35 mg L^{-1} h^{-1} であったが、細胞内外の FFA 量を合わせた FFA の総生産速度は 1.8 mg L^{-1} h^{-1} であった。このことは、dAS1T では細胞内の FFA の生産速度が FFA の放出速度よりも速く、FFA が細胞内に蓄積していることを示している。そこで、細胞外への FFA の受動拡散を促進するために有機溶媒を利用した二相培養系を構築した。すると、dAS1T の FFA 放出速度は培養期間全体の平均値で 1.5 mg L^{-1} h^{-1}、最大値では 3.1 mg L^{-1} h^{-1} にまで増加し、目標値に大きく近付いた。一方で、細胞乾燥重量（DCW）あたりの FFA 放出量は 0.36 g FFA g^{-1}DCW に留まり、目標値の 10 分の 1 以下であった。そこで FFA 生産の間の細胞増殖を抑制するために、高親和性の硝酸イオン／亜硝酸イオン輸送体（NRT）の欠損株から FFA 生産株（dAS2T）を作製した。NRT の欠損株は硝酸イオンを唯一の窒素源とする培地で培養した場合、野生株に比べて増殖速度が減少する（Maeda and Omata 1997）。実際に脂肪酸生産株である dAS2T でも、対照株である dAS1T と比べて硝酸培地における細胞の増殖速度が低下した。しかしながら、同時に FFA の放出量も dAS1T の数分の一に減少してしまった。そこで *S. elongatus* がもつ内在性の RND 型 FFA 排出ポンプである RND1 を dAS2T で過剰発現させたところ、FFA の放出量のみが dAS1T と同程度に回復し、細胞乾燥重量とほぼ等量の FFA が細胞外に放出された。このように、本研究では FFA 生産と細胞増殖とを脱共役させることに成功し、ラン藻の FFA 生産性を先行研究の数倍以上に向上させた。

biofuel production, cyanobacteria, photosynthesis

発表責任者：小俣達男（omata@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A12p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A12 会場

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 遊離脂肪酸生産株の低温環境下における生育不良の要因
Mutation in the acyl-ACP synthetase gene impairs acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to low temperature

○氣多 澄江[1,4]、猿橋 保乃佳[1]、高谷 信之[2,4]、池田 和貴[3,4]、小島 幸治[2]、松本 宇生[1]、小俣 達男[2,4]、愛知 真木子[1,4]（[1]中部大応用生物、[2]名大院生命農、[3]理研 IMS、[4]JST-MIRAI）
○Sumie KETA[1,4], Honoka SARUHASHI[1], Nobuyuki TAKATANI[2,4], Kazutaka IKEDA[3,4], Kouji KOJIMA[2], Ui MATSUMOTO[1], Tasuo OMATA[2,4], Makiko AICHI[1,4] ([1]Chubu Univ., [2]Nagoya Univ., [3]RIKEN, [4]JST-MIRAI)

大気 CO_2 濃度の上昇軽減と化石燃料枯渇への対策のため、再生可能エネルギー・資源の導入が求められており、バイオ燃料生産が必要とされている。しかしながら、現状の藻類バイオ燃料生産の主流であるトリアシルグリセロール生産は多くの努力にも関わらず、エネルギー収支、経済収支の観点から産業化に踏み出せていない。この原因は、生産物を細胞内にとどめていることにより、細胞あたりの生産量が少ないことにあると考え、我々は脂肪酸のリサイクルに関与する長鎖 acyl-ACP 合成酵素遺伝子(*aas*)の破壊により、ラン藻に生産させた脂肪酸を細胞外へ放出させる系の高効率化を進めている。今後、脂肪酸生産株を大量培養する際には屋外での培養が必要となるが、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 （以下 *Synechocystis*）の *aas* 破壊株は低温(22℃)で生育が抑制される。

そこで本研究では、低温での生育抑制回避を目的として、その原因の解明に取り組んでいる。*Synechocystis* における低温環境への適応は、膜脂質の不飽和化によって行われることが報告されているので(Wada and Murata, 1990)、まず、*aas* 破壊株の低温環境下における膜脂質の組成を調べた結果、野生株と有意な違いはなく不飽和化の異常による生育阻害の可能性は低いと考えられた。一方、*aas* 破壊株において細胞内外の遊離の脂肪酸やリゾ脂質の総量が顕著に増加したことから、これらの蓄積が原因であることが示唆された。さらに、野生株に比べて *aas* 破壊株において 22℃で 18:3 等の多価不飽和脂肪酸が大幅に増加していることに注目し、不飽和脂肪酸の蓄積が生育に影響を与えている主な要因であると考えた。不飽和脂肪酸の毒性の原因として、その過酸化が考えられたため、本研究では、過酸化の基質となる不飽和脂肪酸を減じるために、*aas* と Δ6 不飽和化酵素遺伝子(*desD*)の二重破壊株を作製した。その解析結果について報告し、*aas* 破壊株の低温における生育不良の要因について考察する。

本研究は、JST-CREST 研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」および JST-未来社会創造事業「地球規模課題である低炭素社会の実現」領域の一環として行われた。

cyanobacteria, Free fatty acid, low temperature tolerance

発表責任者：愛知真木子（makiko@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2A12p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A12 会場

乳酸を利用した水素発酵技術の開発

Development of hydrogen fermentation methodology using lactic acid

○若井 祐樹、大西 章博、藤本 尚志、蒋 紅与 (東農大)
○Yuki WAKAI, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Hongyu JIANG (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】未利用バイオマスの有効な活用法としてバイオ燃料化が検討されている。しかしながら、食品系廃棄物などを燃料化する場合に問題となるのは収集運搬過程で生じる雑菌汚染である。本研究では、廃棄物に乳酸を添加することで雑菌の発生を抑制し、燃料生産収率を改善するための技術について検討した。乳酸は 0.125～4.5%の間で一般細菌への静菌作用を示すことが知られている。一般的な水素発酵菌である *Clostridium* 属は乳酸による影響を受けるため、乳酸を添加した発酵基質では水素生成効率が低下した。本研究では、乳酸資化性水素発酵菌である *Megasphaera elsdenii* を併用することによって、新たな水素生産システムの可能性を検討した。

【実験材料と方法】供試菌株には乳酸非資化性水素発酵菌として *Clostridium butyricum* IAM14194^{T} 株と、既知の *Clostridium* 属との 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が低い分離株 *Clostridium* sp. DS 株(以下 DS 株とする)を用いた。また、乳酸資化性水素発酵菌として *Megasphaera elsdenii* DSM20460^{T} 株を用いた。供試培地には YNB 改変培地(Difco™ Yeast Nitrogen Base 10%、Bacto™ Proteose Peptone NO,3 0.5%、酵母エキス 0.5%、グルコース 0.5%、pH7.0)に約 70%乳酸ナトリウムを終濃度が 2.5%となるように添加して実験に用いた。125 ml 容バイアル瓶に供試培地を充填し、気相部を窒素置換して密封後、オートクレーブ滅菌して実験に用いた。前培養した供試菌株を、菌体濃度として OD_{660} がおよそ 0.1 となるように接種し、48 時間、37℃、90rpm で振盪培養した。培養後にガス生成量、水素濃度、濁度、pH を測定した。

【結果及び考察】乳酸ナトリウム無添加系における水素生成量は基質 50 ml 当たり、*C. butyricum* で 65.1 ml、DS 株で 28.4 ml、*M. elsdenii* で 61.0 ml だった。またこの時の OD_{660} は *C. butyricum* で 4.4、DS 株で 1.9 だった。乳酸ナトリウムを添加した系における水素生成量は、*C. butyricum* で 60.2 ml、DS 株で 26.9 ml、*M. elsdenii* で 166.2 ml だった。またこの時の OD_{660} は *C. butyricum* で 1.3、DS 株で 0.9 だった。乳酸非資化性菌は乳酸ナトリウム無添加系と比べて同程度の水素生成量を示し、OD_{660} は半分以下の値を示した。これらのことから *C. butyricum* や DS 株は乳酸による静菌作用の影響で水素生成能が低下することが示唆された。また *C. butyricum* と *M. elsdenii* の共培養系の水素生成量は 210.2 ml で、*C. butyricum* 単独系と比べて約 3.5 倍の水素生成量であった。

hydrogen fermentation, lactic acid, *Megasphaera*

講演番号：2A12p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A12 会場

超好熱菌によるキチンからの水素生産系の構築
Construction of a system for chitin-dependent hydrogen production using a hyperthermophile
○金井 保[1,2]、Aslam Mehwish[1]、堀内 あゆみ[1]、Simons Jan-Robert[1,2]、Jha Savyasachee[1,2]、山田 将大[1]、小谷 徹[1]、藤本 理夏子[1]、山本 康之[1]、郡司 遼馬[1]、今中 忠行[2,3]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大院工、[2]CREST・JST、[3]立命・総合科技研)
○Tamotsu Kanai[1,2], Mehwish Aslam[1], Ayumi Horiuchi[1], Jan-Robert Simons[1,2], Savyasachee Jha[1,2], Masahiro Yamada[1], Toru Odani[1], Rikako Fujimoto[1], Yasuyuki Yamamoto[1], Ryoma Gunji[1], Tadayuki Imanaka[2,3], Haruyuki Atomi[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]CREST・JST, [3]Ritsumeikan Univ.)

((目的・背景) キチンは *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を基本骨格とする天然多糖である。キチンの存在量は、セルロースに次ぐ規模であるが、その利用は極めて限定的である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はキチン分解・資化に関与する代謝系をもつものの、キチン依存的な生育は確認されていない。本研究では、遺伝子工学的手法（genetic engineering）と培養工学的手法（adaptive engineering）を組み合わせ、キチンを効率良く分解できる *T. kodakarensis* 株の育種を目指した。
(方法・結果) 遺伝子組換えが可能な *T. kodakarensis* KU216 株(Δ*pyrF*)をホスト株として、キチナーゼ(ChiA)をコードする遺伝子のプロモーター領域を高発現型の *csg* プロモーターに置換した KC01 株を作製した。KC01 株を 0.4%(w/v)キチン(swollen chitin)含有培地を用いて培養した結果、本株がホスト株よりも高いキチン分解能をもち、また培地中に ChiA 反応の生成物である$(GlcNAc)_2$ を蓄積することが判明した。次に KC01 株を親株として$(GlcNAc)_2$ 以降の資化に関与する 1) deacetylchitobiose deacetylase 遺伝子(*dac*)、2) exo-*β*-D-glucosaminidase 遺伝子(*glmA*)と glucosamine 6-phosphate deaminase 遺伝子(*glmD*)を含むオペロン(*dppABCDF-glmD-glmA*)、の両プロモーター領域を、それぞれ高発現型プロモーターに置換した株（KC04）を作製した。また解糖系代謝 flux の強化のため、KC04 株を親株として、解糖系遺伝子群の転写抑制因子である Tgr の遺伝子破壊を行った KC04Δt 株を作製した。これらの KC04 株と KC04Δt 株は、KC01 株よりも高いキチン分解能を示すものの、培養液中のキチンは完全には分解されず、さらには培養液の変色（褐色）が確認された。この時、培地中へのグルコサミンの蓄積が観察されたことから、代謝反応におけるボトルネックの存在が示唆された。そこで、より優れたキチン資化能を示す株の取得に向け、adaptive engineering 手法による育種を試みた。KC04Δt 株を親株として、キチン含有培地を用いた培養と植え継ぎを 13 回繰り返すことで、当該培地での生育速度が顕著に向上した KC04ΔtM1 株を取得した。本株は培地中のキチンを完全に分解可能であり、また代謝産物である酢酸やアンモニアを顕著に多く蓄積することが判明した。さらには本菌株のキチン含有培地での培養に伴って、水素(H_2)が生成することが判明した。キチンの消費量から計算された H_2 への変換率は 18.7 ± 1.1 mmol H_2 g^{-1} [swollen chitin, consumed]であり、理論値の約 85%に相当する非常に高いレベルであることが判明した。本菌株の取得は、超好熱菌を用いたキチンからの水素生産系の実現に向けた端緒となる結果と言える[1]。

[1]Aslam, M. *et al.*, ***Appl Environ Microbiol*** 83:e00280-17 (2017).

chitin, hydrogen gas, hyperthermophile

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A12p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A12 会場

白色腐朽菌による木質バイオマスからの好気的水素産生に関する研究

Studies on aerobic hydrogen production from woody biomass by white-rot fungi

○高橋 沙綾[1]、森 智夫[2]、河岸 洋和[2,3,4]、平井 浩文[2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大農・応生科、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○Saaya TAKAHASHI[1], Toshio MORI[2], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4], Hirofumi HIRAI[2,3] ([1]Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

近年、地球温暖化や化石資源の枯渇などの問題から、従来利用されてきた化石燃料の代替となるエネルギーとして、利用段階で二酸化炭素を排出しない水素が注目されている。現在の水素製造法には二酸化炭素の排出といった問題点があり、低炭素循環型社会の実現のため、カーボンニュートラルなバイオマスからの水素産生技術の構築が必須である。これまでに当研究室では、自然界より分離した白色腐朽菌による木質バイオマスからの水素産生を初めて報告し、新たな木質バイオリファイナリーの可能性を探求してきた[1)]。

本研究では、水素産生白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による木質バイオマスからの水素産生量の向上を目標に水素産生特性の調査を行った。また、水素産生と *T. versicolor* K-41 株由来ヒドロゲナーゼ様遺伝子（*TvK41hyd*）の関連性についても調査した。

【方法・結果】

T. versicolor K-41 株を含水率 85%の滅菌済みスギ木粉へ接種し、5 日間前培養後、密栓し、酸素／窒素混合ガスでバイアル内の酸素濃度を 1～100%となるように置換した。2 週間培養後、GC-TCD 分析により水素産生量を測定した。その結果、酸素濃度 10%以上で水素産生が確認され、本菌は一般的な嫌気性微生物による水素産生とは異なり、好気下で水素産生することが明らかとなった。また、各酸素濃度で生育した菌体より total RNA を抽出後、RT-PCR により *TvK41hyd* の発現解析を行った結果、初期酸素濃度 1～100%全ての場合で *TvK41hyd* の発現が確認されたものの、*TvK41hyd* と水素産生の関連性は不明瞭であった。

よって *TvK41hyd* cDNA を取得し、*TvK41hyd* 組換え大腸菌を作出し、*TvK41hyd* の水素産生活性を測定した。既報[2)]に従い微好気条件下における組換え大腸菌の水素産生量を測定した結果、空ベクター導入株よりも有意に高い水素産生が確認され、白色腐朽菌 *T. versicolor* K-41 株のヒドロゲナーゼ様遺伝子 *TvK41hyd* が水素産生に関与していることが明らかとなった。

【参考文献】

1) 有本美沙ら、第 60 回リグニン討論会 講演集、38-41 (2015).
2) J. Y. Kim, B. H. Jo, H. J. Cha, *J. Biotechnol.*, 155, 312-319 (2010).

white-rot fungi, hydrogen production, hydrogenase

発表責任者：平井浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A12p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A12 会場

Rhodobacter sphaeroides の代謝改変による酢酸からの水素収率の向上

Improvement of H_2 yield from acetate by metabolic engineering of *Rhodobacter sphaeroides*

○清水 哲[1]、寺本 陽彦[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Tetsu SHIMIZU[1], Haruhiko TERAMOTO[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は、大腸菌による暗発酵と紅色非硫黄細菌による光発酵を組み合わせたセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産プロセスの開発に取り組んでいる。暗発酵では熱力学的な制約によりグルコースは酢酸までしか酸化されないのに対し、紅色非硫黄細菌を用いた光発酵では光エネルギーの利用により酢酸の完全酸化による水素生産が可能なため、両発酵プロセスの統合により原料バイオマスあたりの水素収率の大幅な向上が期待される。しかしながら、代表的な紅色非硫黄細菌である *Rhodobacter sphaeroides* の酢酸からの水素収率は他の有機酸を基質とした場合と比較して低いことが知られている。そこで本研究では、*R. sphaeroides* の酢酸からの水素収率向上のため、遺伝子工学による代謝改変について検討した。

【方法と結果】*R. sphaeroides* ATCC 17023 を親株として、二回交差法によりクロトニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ遺伝子(*ccr*) 破壊株、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)合成酵素遺伝子(*phaC*)破壊株を作製した。ついで *Rhodobacter capsulatus* 由来リンゴ酸シンサーゼ遺伝子(*aceB*)、イソクエン酸リアーゼ遺伝子(*aceA*)を光誘導型プロモーターの制御下に置いたプラスミド(pMGP*puc::aceBA*)を作製し、野生株および各破壊株にそれぞれ導入し、WT/ace、Δ*ccr*/ace、Δ*phaC*/ace 株を作製した。作製した各株を炭素源として酢酸、窒素源としてグルタミン酸を添加した無機塩培地にてアルゴン雰囲気下、光照射条件で培養し、生成水素をガスクロマトグラフィーにより定量した。

R. sphaeroides の酢酸資化経路であるエチルマロニル CoA 経路(EMC 経路)を *ccr* の破壊により遮断したところ、水素生産能が消失した。従って *R. sphaeroides* において EMC 経路が酢酸からの水素生産を担う唯一の経路であることが示された。一方でΔ*ccr*/ace は野生株と同レベルの水素を生産し、導入したグリオキシル酸経路が *R. sphaeroides* において機能し、水素生産に寄与することが示された。WT/ace は野生株と比較して 1.6 倍の水素を生産し、内在性の EMC 経路と導入したグリオキシル酸経路双方が相加的に TCA サイクルを補充することで水素生産に必要な還元力を効率的に供給できることが示唆された。興味深いことに、Δ*phaC* は野生株と比較して 1.2 倍の水素を生産した一方で、同株へのグリオキシル酸経路の導入は水素生産に有意な影響を及ぼさなかった。このことから、これまで水素生産と競合すると考えられてきた PHB 生合成が、代謝状態によっては水素生産に対してむしろ有益となり得ることが示唆された。

photofermentative hydrogen production, *Rhodobacter sphaeroides*, nitrogenase

発表責任者：乾将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：2A12p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A12 会場

イソプレノイド生合成酵素スクリーニング系の構築

Construction of a screening system for isoprenoid biosynthesis enzymes

○町田 裕樹[1,2]、生出 伸一[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Hiroki MACHIDA[1,2], Shinichi OIDE[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】イソプレノイドは、非常に多様な化学的性質、生理的機能を有する多数の化合物からなる巨大化合物群である。商業的な利用に関しても、医薬、抗菌剤、香料、着色料、ポリマー原料、燃料など多岐にわたるが、有用イソプレノイドの多くは、自然界において産業利用できる量あるいは状態として存在しない。化学合成による生産については、構造の複雑さや生産コストなどの理由で事業化は困難であると考えられており、現在、バイオエンジニアリングによる低コスト・高効率なイソプレノイド生産プロセスの確立が期待されている。本研究では、コリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) による、糖を原料としたイソプレノイド高生産技術の開発の一環として、汎用性が高く簡便なイソプレノイド生合成酵素の *in vivo* スクリーニング系の構築を試みた。
【方法と結果】本スクリーニング系では、イソプレノイド化合物 lycopene の蓄積に起因する菌体の着色に基づき、目的酵素の活性を相対的に評価する。*C. glutamicum* においてイソプレノイド化合物は 2-*C*-methylerythritol 4-phosphate (MEP) 経路由来の isopentenyl diphosphate と dimethylallyl diphosphate から生成される。我々は一般的に MEP 経路の律速酵素であるとされている 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) の強化をモデルとして、スクリーニング系の開発を進めることにした。まず、lycopene elongase をコードする *crtEb* 遺伝子の破壊により、*C. glutamicum* lycopene 蓄積株を構築した。本株において多様な生物由来の DXS を高発現させ、菌株の着色を視覚的に評価し、lycopene 由来の赤色が強い DXS 発現株の選抜を行った。さらに、これらの DXS 発現株中の DXS 活性を *in vitro* で評価し、酵素活性と菌体の着色の相関を検証した。本スクリーニング系は、タンパク質抽出やイソプレノイド化合物の定量を必要としない簡便な手法である。また、*in vivo* スクリーニング系であるため、中間代謝物の阻害など *in vitro* では正確に再現することが難しい細胞内の条件下において酵素の選抜を行うことができる点も本手法の利点と言える。

metabolic engineering, MEP pathway, terpenoid

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：2A13a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A13 会場

オリゴ糖類の摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討
Effects of dietary oligosaccharides on colonic ALP activity and the gene expression in rats fed a high-fat diet.

○岡崎 由佳子、久保 葉月、本間 れいか、関根 史織、高橋 李奈（1. 藤女子大・人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Hazuki KUBO, Reika HONMA, Shiori SEKINE, Rina TAKAHASHI (Fuji Women's Univ.)

【目的】Alkaline phosphatase(ALP)は，アルカリ性条件下でリン酸化合物を分解する糖タンパク質酵素で，細菌から高等動物まで幅広く分布している。近年，生体内の ALP の中でも小腸型の ALP は，腸管内での抗炎症作用が指摘され，栄養条件による変動も報告されている。最近我々は，高脂肪食摂取ラットにおいて，グルコマンナンをはじめとする数種の水溶性食物繊維が，小腸 ALP には影響を与えずに大腸 ALP 活性を特異的に増加させ，そのメカニズムに ALP 遺伝子（*IAP-I*）の発現誘導が関与していることを示した [1)]。このとき大腸 ALP 活性は，腸管バリア機能の指標である Mucin 含量や盲腸内容物の酪酸含量と正の相関関係にあることを明らかにした。我々は，このような発酵性難消化性物質が普遍的に大腸 ALP を誘導するのではないかと推察している。本研究では，数種のオリゴ糖を用いて大腸 ALP への影響の比較検討を行い，大腸 ALP と Mucin，有機酸，腸内細菌叢との相関を調べた。
【方法】実験動物として，4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。基本食として，30%ラード・5%セルロース食を用いた。実験食には，難消化性オリゴ糖のフルクトオリゴ糖（FOS），ガラクトオリゴ糖（GOS），ラフィノース（RAF）およびラクチュロース（LAC）と，一部消化性オリゴ糖のイソマルトオリゴ糖（IMOS）を用い，セルロースに置き換えて 4%添加した。実験飼料は 14 日間自由摂取させた。飼育終了後，大腸および小腸の ALP 活性の測定と，ALP 遺伝子（*IAP-I, Akp3, Alpl*）の発現解析（RT-PCR 法）を行った。さらに，糞中 Mucin（蛍光光度法），盲腸有機酸（HPLC 法），糞中の腸内細菌叢（qPCR 法）を解析した。
【結果】大腸 ALP 活性は FOS と RAF 添加食群により有意に増加し，GOS と LAC 添加食群で同様の増加傾向が示された。大腸 ALP 遺伝子発現については，小腸全域に局在する *IAP-I* 発現が FOS，GOS および RAF 添加食群で有意に増加し，LAC 添加食群で同様の増加傾向を示した。Mucin，酪酸，*Bifidobacterium* spp.の割合は FOS，GOS，RAF および LAC 添加食群で有意に増加し，*Clostridium coccoides* の割合は有意に低下した。一方，一部消化性の IMOS 添加食群では，大腸 ALP 活性，遺伝子発現，ムチン，有機酸，腸内細菌叢に対してほとんど影響を示さなかった。大腸 ALP 活性と腸内環境関連因子との相関を調べたところ，Mucin，酪酸，*Bifidobacterium* spp.との間には有意な正の相関が認められ，*Clostridium coccoides* との間には負の相関関係が示された。以上より，大腸 ALP 活性と *IAP-I* 遺伝子発現の誘導は，発酵性難消化性物質に共通した作用であると推定した。

1) Nutrition Research, 2017, 43, 43-50

Oligosaccharides, Colon, Alkaline phosphatase

講演番号：2A13a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A13 会場

メイラード反応生成香気（DMHF）曝露が脳内遺伝子発現に及ぼす影響
Effect of maillard reaction odor (DMHF) exposure on brain gene expression
○横山 壱成[1]、中井 雄治[2]、鈴木 喜博[1]、大畑 素子[3]、小宮 佑介[1]、有原 圭三[1] ([1]北里大獣医、[2]弘前大食料研、[3]日大生資科)
○Issei YOKOYAMA[1], Yuji NAKAI[2], Yoshihiro SUZUKI[1], Motoko OHATA[3], Yusuke KOMIYA[1], Keizo ARIHARA[1] ([1]Kitasato Univ., [2]IFS,Hirosaki Univ., [3]Nihon Univ.)

【背景・目的】
香気成分の中には嗅覚器によって受容された後、脳や自律神経系に影響することによって様々な生理作用を引き起こすものが存在している。我々は食品の加熱調理・加工時のメイラード反応により生成する香気に注目し、メイラード反応生成香気中の 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone（DMHF）が自律神経系に作用し、血圧降下を誘発することを見出した。しかし、このような香気成分の生理作用に関する研究は、遺伝子レベルにおける報告はあまりされていない。そこで、本研究は DMHF の曝露がラットの脳における遺伝子発現に及ぼす影響の解明を目的とし、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析を行った。
【方法】
11 週齢の Wistar 系雄性ラットに蒸留水または DMHF を 5 分間曝露し、その後 10 分間静置させた。静置後、ラットを断頭し脳を摘出した。摘出した脳から total RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 array（Affymetrix）を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。得られたデータは DFW 法によって正規化し、主成分分析を行った。また、Rank products 法によって 2 群間で発現の異なる遺伝子を抽出した。さらにウェブツール DAVID および Quick GO を用いて Gene Ontology 解析を行い、抽出された遺伝子群においてどのような機能が有意に変化していたのかを調べた。
【結果】
DNA マイクロアレイ解析データの主成分分析を行ったところ、蒸留水群と DMHF 群ではおおまかに異なるクラスタを形成することが明らかとなった。このことから、DMHF の曝露はラットの脳内遺伝子発現に影響を与えることが考えられた。そこで、2 群間で発現の異なる遺伝子を抽出し、変化した機能を解析した。その結果、DMHF を曝露したラットの脳内では、神経伝達、採食行動、アミン輸送の 3 つの機能が変化していることが明らかとなった。以上の結果から、DMHF の曝露による血圧降下には、mRNA 発現レベルでの神経伝達物質の変化が関わっていることが考えられた。また、DMHF を嗅ぐことによる採食行動への影響も示唆された。今後は、DMHF を曝露した際の神経伝達物質測定を行うとともに、採食行動にもたらす影響についても検討する。

Maillard reaction, Odor, DNA microarray

講演番号：2A13a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A13 会場

血球トランスクリプトーム解析の高精度化にむけた血液処理方法の検討

Development of blood separation method for high accuracy blood transcriptome analysis

○野原 正勝[1]、安岡 顕人[1]、嶋田 耕育[1]、亀井 飛鳥[1]、篠崎 文夏[1]、豊田 集[1]、飯尾 将太[1]、阿部 啓子[1,2] ([1]産技総研、[2]東大院)
○Masakatsu NOHARA[1], Akihito YASUOKA[1], Kosuke SHIMADA[1], Asuka KAMEI[1], Humika SHINOZAKI[1], Tsudoi TOYODA[1], Shouta Iio[1], Keiko ABE[1,2] ([1]KISTEC, [2]Tokyo Univ.)

【背景・目的】

我々は動物実験やヒト試験を行い、食品の有効性や機能性についてトランスクリプトーム解析により評価している。マウスやラットを用いた研究では、脳や肝臓といった組織・臓器単位の採材が一般的であるが、これらの組織や臓器は役割の異なる複数種類の細胞で構成されている。したがってこれらを材料として行われる解析は、平均化されたデータを抽出して全体の変化を評価していることになる。一方、ヒト試験では組織や臓器を採取することは非常に困難であるが採血は容易であり、血液を用いた解析が可能である。しかしながら血液も他の組織・臓器と同様に、複数の種類の細胞からなる。食品に対する個々人の応答のブレを解消し、個々の細胞について食品への応答の小さな変化を捉えるためには、細胞のシングルセル化がトランスクリプトーム解析の高精度化に向けて必要となる。本研究では生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球に着目し、ヒト血液トランスクリプトームの高精度な評価系を確立するために、我々はまず血液から白血球を分離するための条件検討を行い、さらに、得られた白血球サンプルから単一細胞の分離を試みた。

【結果・考察】

供試動物は 8 週齢の雄性 C57BL/6NCrl マウスを使用し、イソフルラン麻酔下で採取した血液を、RNA、タンパク質や細胞を安定に保存可能な細胞保存試薬と混和した。この血液をサンプルとして赤血球凝集試薬、密度勾配分離試薬を用いて血液からの白血球分離を試みたところ、赤血球凝集試薬では得られた細胞懸濁液には白血球のほかに多くの赤血球や血小板が認められ、密度勾配分離試薬では白血球を分離することができなかった。次いで溶血試薬を用いた白血球分離を検討した結果、血液から白血球を分離することができた。この分離法で得られた白血球懸濁液をサンプルとして、流路分離型の単一細胞分離装置を用いてシングルセル化を行った。顕微鏡観察により細胞の捕捉率を算出した結果、65%以上と高い捕捉率でシングルセルが認められた。単一細胞分離の検討の過程で、血小板によるコンタミネーションの問題が生じたが，この問題は血球洗浄による血小板の除去により解決した。

本研究の特徴である細胞保存試薬と混和した血液から白血球を分離する方法を確立し、さらにこの細胞懸濁液を用いて高い捕捉率でのシングルセル化を実現した。今後はヒト試験実への用化に向けて、普遍的な未病マーカーの選定や細胞を安定に保存できる期間の検討を行う予定である。

Leucocyte, Single cell, Transcriptome analysis

講演番号：2A13a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A13 会場

加熱処理 Lactobacillus crispatus KT-11 の摂取が口腔内環境に与える影響

Effect of oral administration of heat-treated lactobacillus crispatus KT-11 on oral cavity environment

○渡邉 樹[1]、齋藤 真規[2]、友清 帝[1]、飛田 啓輔[1]([1]株式会社キティー、[2]日大松戸歯学部)
○Itsuki WATANABE[1], Masanori SAITO[2], Mikado TOMOKIYO[1], Keisuke TOBITA[1] ([1]KITII Co., Ltd., [2]Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

【目的】ヒト由来の乳酸菌 *Lactobacillus crispatus* KT-11（KT-11 株）は、マウスを用いた動物試験で唾液中への分泌型 IgA 産生促進を介して *Porphyromonas gingivalis* による歯槽骨破壊を抑制することから、歯周病予防効果を有するこが報告されている１)。本研究では、KT-11 株摂取による健康者の口腔内環境への影響を検証することを目的とした。
【方法】虫歯が無いと自覚している健常な日本人成人男女 21 名から医師の問診及び選抜基準からボランティア 16 名を選抜し、ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を行った。加熱処理により殺菌した KT-11 株を 1 粒あたり 0.4×10^{10} 含有した試験食品（錠菓）を 1 日 3 回、毎食後に 1 錠を噛まずに最後まで舐めて摂取する方法で 4 週間継続摂取させた。摂取前および摂取後において、唾液中の主な歯周病原菌数、プラークスコア、および唾液量を解析した。歯肉状態について、歯肉の赤味および腫れを VAS 法により評価した。
【結果】KT-11 株摂取群では、プラセボ食摂取群と比較して 4 週後の唾液中 *P. gingivalis* の数が減少した。また、男女別で比較解析を行ったところ KT-11 株を摂取した女性において、プラセボ群と比べ歯肉の赤味、腫れおよびプラークスコアの減少が見られた。以上の結果から、KT-11 株の摂取は口腔内環境の改善を介して歯周病予防に寄与する可能性が示唆された。
１）田口ら：IJOMS、13: 102-109 (2015)

Lactobacillus crispatus KT-11, lactic acid bacteria, periodontal disease

講演番号：2A13a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A13 会場

酵素合成β-1,3-グルカンの抗気管支喘息作用
Anti-asthmatic effect of enzymatically synthesized β-1,3- glucan
○川﨑 悠矢[1]、西尾 昌洋[1]、中川 奈美[1]、河野 光生[2]、磯野 直人[1]、栗谷 健志[1]、梅川 逸人[1]([1]三重大院生物資源、[2]三重大院医)
○ Yuya KAWASAKI[1], Masahiro NISHIO[1], Nami NAKAGAWA[1], Mitsuo KAWANO[2], Naoto ISONO[1], Kenji KURIYA[1], Hayato UMEKAWA[1] ([1]Mie Univ. Bioresources, [2]Mie Univ. Med.)

【目的】現在使われているβ-1,3-グルカンは微量にβ-1,6-グルカンも含むことが多く，β-1,3-グルカンのみの機能を明らかにすることは困難である。我々は，グルコース 1-リン酸を原料としたβ-1,3-グルカンの人工合成法で様々な重合度のβ-1,3-グルカンをβ-1,3-グルカンホスホリラーゼを用いることで合成した。そこでβ-1,3-グルカンが重合グルコース数 (DP70)での，気管支喘息 (OVA-)モデルマウスと DP70 の炎症性マクロファージ様細胞 (RAW264.7)に与える影響と DP33,70 のヒト好塩基球様細胞 (KU812)を用いて抗喘息作用を検討することを目的とした。
【方法】雄性 BALB/c マウス (7 週齢) を用い，オボアルブミン (OVA)と免疫賦活剤 Alum を混合したものを，1 週間毎に 3 回腹腔内投与を行い，ネブライザで DP70：0.01, 0.1, 1 mg/ml)を毎日 20 分，計 5 日間吸入投与し，肺切片における iNOS の発現量を免疫染色により検討した。RAW264.7 細胞を用い，LPS 刺激による炎症について DP70 投与が iNOS· IL-1β· COX-2· IL-6 mRNA (RT-PCR) と NO· 分泌 (Griess 法)で計測した。KU812 細胞では，A23187 刺激で炎症を惹起した DP70 投与が炎症性サイトカイン(IL-8)と DP33,70 投与が pMAPK (リン酸化)量を変化させるかを検討した。
【結果】OVA-モデルマウスでは，気管支切片の iNOS 量は OVA 投与群に比較して OVA-DP70 投与群では有意に抑制された。RAW264.7 では，RT-PCR で LPS 投与群では無添加群と比較して有意に *iNOS* mRNA 発現の上昇が見られ，LPS-DP70 群では LPS 投与群に比較して有意ではないが減少傾向にあり，LPS 投与群と LPS-DP70 (1 μg/mL)群では，*COX-2* を有意に減少させた。NO· の抑制は，LPS-DP70 (100 μg/mL)群では LPS 投与群に比較して有意に抑制された。KU812 では，DP70 添加後-A23187 刺激にて *IL-8* が有意に抑制され，細胞内情報系では pERK1/2 を抑制する傾向と pp38 を増加する傾向がみられた。酵素合成β-1,3-グルカン (DP70)は OVA-気管支喘息モデルにおいて *iNOS*/*COX-2* の系を減弱させ，RAW264.7 (マクロファージ)は NO 系の減弱・KU812 (ヒト好塩基球)は，pERK と IL-8 の発現は減弱させ，pp38 は増加させ，マクロファージ・好塩基球・気管支平滑筋では，それぞれが異なる抗喘息効果を有することが示唆された。

β -1,3-glucan, asthma

発表責任者：梅川　逸人（umekawa@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A13a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A13 会場

Chemical, microbiological and functional analysis of kefir grown in cow milk and soymilk

○Raul Ricardo GAMBA[1], Shihori YAMAMOTO[1], Tetsuya SASAKI[2], Toshihide MICHIHATA[2], Takashi KOYANAGI[1], Toshiki ENOMOTO[1] ([1]Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University, [2]Chemistry/Food Department, Industrial Research Institute of Ishikawa)

Kefir is ancient fermented milk originated from Caucasians Mountains. Kefir has got different properties thanks to it classified as a probiotic. Soymilk is a beverage obtained from soy beans that has got interesting nutritional characteristics. The aim of the work is to study the chemical, microbiological and functional properties of kefir grown in cow milk and soymilk.

Milk and soymilk were inoculated with kefir grains CIDCA AGK1 (10% w/v) and fermentations were carried out for 24 h at 25°C. Then, kefir grains were recuperated and were used for fermented beverage production. Kefir samples were taken and dilutions were performed in peptone water (0.1% w/v). Diluted samples were inoculated in four media (MRS and GAM agar for lactic acid bacteria, PDA for yeasts and AAB agar for acetic acid bacteria). Fermented beverages were centrifuged and supernatants were filtrated by 0.45 μ membranes. The cell free supernatants obtained were used for amino acids and organic acids determinations. Additionally, antibacterial (against *E. coli*, *S. aureus* and *S. tiphymurium*), antioxidant and ACE inhibitory activity were measured

The fermented milk (4.26±0.10) and soymilk (4.40±0.05) reached a similar pH. However, fermented soymilk decreased to 53% and 38% of lactic and acetic acids compared to that of fermented milk, respectively. Citric acid of fermented soymilk increased by 238% compared to that of fermented milk. As for amino acids concentrations, 17 of 20 amino acids were detected in milk and soymilk, in different concentrations. Eight and 7 of essential amino acids were detected in milk and soymilk, respectively. Total amino acids of fermented milk were 5788 mg/100 ml (1094 mg of essential amino acids). Soymilk presented 3705 mg/100 ml (1252 mg of essential amino acids) of amino acids. Viable counts showed lactic acid bacteria were detected between 10^8-10^9 CFU/ml and 10^9 CFU/ml in milk and soymilk, respectively. Acetic acid bacteria were detected 10^7 CFU/ml in milk, whereas they were not detected in soymilk. Yeasts were detected between 10^6-10^7 CFU/ml and 10^4 CFU/ml in milk and soymilk, respectively. Additionally, both fermented milk and soymilk showed bactericidal activity against *E. coli*, *S. aureus* and *S. tiphymurium*. On the other hand, fermented milk increased significantly its antioxidant activity compared to that of unfermented one; whereas antioxidant activity of fermented soymilk changed slightly. ACE inhibitory activity increased after fermentation in both samples. In conclusion, both fermented milk and soymilk showed interesting chemical, nutritional and functional properties that enhance the probiotic character of kefir

Kefir, Soymilk, Probiotic properties

発表責任者：榎本俊樹（enomoto@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A13a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A13 会場

塩ストレス条件下で栽培したトマト果実に発現するマイクロ RNA の解析

Expression analysis of mRNA and miRNA of tomato cultivated under salt stress condition

○朝倉 浩子、山川 隆、阿部 啓子、朝倉 富子（東大院・農生科）
○Hiroko ASAKURA, Takashi YAMAKAWA, Keiko ABE, Tomiko ASAKURA (The university of Tokyo)

＜背景＞

トマトはカロテン、リコペン、ポリフェノール、ビタミンCなどの機能性成分を含み、生食だけではなく多くの加工品に利用される世界中で最も消費されている野菜のひとつである。トマトは、甘味、酸味、旨味のバランスが特に重要とされ、トマト特有の匂いや味は品種を特徴付ける物質として解析されている。このように、品種改良による品質の向上や目的に合った品種の作出が試みられている一方で、栽培方法を工夫することで栄養価や食味を向上させる試みも行われている。トマトをストレス条件下（乾燥、低栄養など）で栽培すると糖やアミノ酸、有機酸の生産量が増加することが知られている。果実の登熟期に植物体がストレスを受けると、そのストレスを解除するための代謝系が動く。ストレス応答ホルモンの増加やアミノ酸、硫黄代謝物などの二次代謝物である。これらの化合物の中には食品の機能性成分として働くものも含まれていることが報告されている。また、二次代謝物以外に、マイクロ RNA（miRNA）も変動することが予測される。本研究では、塩ストレス下で生育したトマト果実中の miRNA を解析し、トマトの生理機能に及ぼす影響を探ることとした。

＜方法・結果＞

実験用矮性品種であるマイクロトムを、開花後から 0.4%の塩水を与え、完熟まで塩ストレス条件下で栽培した。登熟期および完熟期の果実から miRNA を抽出し、Real-time PCR に供した結果、塩ストレス下に晒されたトマトの果実内で複数の miRNA において顕著な発現量の変化が見られた。これらの miRNA の配列からターゲット遺伝子の予測を行い、標的遺伝子の mRNA レベルの発現量を Real-time PCR を用いて測定した。その結果、塩ストレス下において、アミノ酸の生合成に関連する分子の発現が miRNA によって制御されている可能性が示された。

tomato, miRNA

講演番号：2A13a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A13 会場

アミロイド形成の可視化を目的とした新規量子ドットプローブの創製

A novel quantum dot probe to enable imaging of fibril formation for amyloidal protein

○飯田 陽一[1]、片山 茂[1]、三谷 塁一[1]、中林 昌基[1]、徳楽 清孝[2]、中村 宗一郎[1]（[1]信州大院農、[2]室蘭工大院工）
○ Yoichi Iida[1], Shigeru Katayama[1], Takakazu Mitani[1], Masaki Nakabayashi[1], Kiyotaka Tokuraku[2], Soichiro Nakamura[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Muroran Inst. Tech.)

【背景】アミロイドーシスは、タンパク質が線維化し沈着することにより生じる重篤な疾患群の総称である。アミロイド線維量の評価には、アミロイドタンパク質の β シート構造に特異的に結合するチオフラビン T を用いた方法が主に用いられているが、動的観察が困難であるという指摘もある。一方近年、蛍光物質である量子ドット（Qdot）を用いた生体内イメージング法が数多く開発されており、アミロイドタンパク質のアミロイド線維形成のプローブとしての応用が期待されるようになった。そこで本研究では、アミロイド凝集性を示すことで知られるアミロイド β（Aβ）、インスリン、およびリゾチームを標的として、アミロイド凝集をモニターできる新規量子ドットナノプローブ（QDP）の創製に取り組んだ。
【方法】プローブ候補ペプチドには、アミロイド凝集性を示すことが知られる 6 種のペプチド（KLVFFAE, LVFFA, GNNQQNY, STVIIE, VTVTVT, LIVAGD）を選別し使用した。これらのペプチドと Qdot を結合させ、6 種類の QDP を作製した。QDP とアミロイドタンパク質を 1536 well プレート内で 24 時間、37℃でインキュベーションし共凝集させた。その後、蛍光顕微鏡にて観察画像を撮影し、ソフトウェア ImageJ を用いて画像解析し、凝集体量を数値化した。
【結果】調製した 6 種の QDP のアミロイド線維形成探索能について、$A\beta_{1\text{-}42}$ を用いて検討した。6 種の QDP はいずれも有効な機能を有していることが認められた。しかし一方では、プローブ非結合の Qdot 単体でも $A\beta_{1\text{-}42}$ と非特異的な結合が生じることが示された。そこで、Aβ の神経毒性のコア領域である $A\beta_{25\text{-}35}$ を標的としたところ、非特異結合は認められず、6 種の QDP によるアミロイド凝集を鮮明に観察できることが示された。なかでも LIVAGD（LD6）を結合させた QDP（Qdot-LD6）は、最も効果的に $A\beta_{25\text{-}35}$ 線維の凝集を標識できることが示された。さらに、Qdot-LD6 を用いて、インスリンおよびリゾチームの線維凝集を観察したところ、$A\beta_{25\text{-}35}$ と同様、効果的にアミロイド線維形成を追跡できることが示された。

amyloidosis, Alzheimer's disease, Qdot probe

発表責任者：中村宗一郎（snakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A13a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A13 会場

渋味を呈するポリフェノールの分子特性解析
Molecular characterization of astringent polyphenols
○前迫 一輝[1]、辻 愛[1]、小林 麻貴[1]、伊藤 圭祐[2]、小林 彰子[3]、赤川 貢[4]、越阪部 奈緒美[5]、石井 剛志[1] ([1]神戸学院大栄養、[2]静岡県大食栄、[3]東大院農、[4]大阪府大院生命環境、[5]芝浦工大システム理工)
○Kazuki MAESAKO[1], Ai TSUJI[1], Maki KOBAYASHI[1], Keisuke ITO[2], Syoko KOBAYASHI[3], Mitsugu AKAGAWA[4], Naomi OSAKABE[5], Takeshi ISHII[1] ([1]Kobe Gakuin Univ., [2]Univ. of Shizuoka, [3]Univ. of Tokyo, [4]Osaka Prefecture Univ., [5]Shibaura Institute of Technology Univ.)

【目的】茶や野菜・果実等に含まれるポリフェノールは苦味や渋味を呈する苦渋味物質であるが、それぞれの味の強度はポリフェノールごとに異なっている。当研究グループではこれまでに、茶ポリフェノールの化学構造の違いがリン脂質膜やタンパク質などの生体成分との分子間相互作用に及ぼす影響を解析し、生体成分への結合親和性と渋味発現との関係について報告してきた。本研究では、渋味強度の異なるポリフェノールを用いて生体成分に対する分子挙動を解析し、渋味を呈するポリフェノールの分子特性を解明することを目的とする。
【方法】試料としてケルセチン（Que)、カフェ酸（CA)、ロスマリン酸（RA)、エピカテキン（EGC)、エピガロカテキンガレート（EGCg)、テアフラビン（TF1)、テアフラビンジガレート（TF3）を用いた。各試料の渋味強度は、味認識装置により評価した。細胞膜透過性は、並行人工膜透析測定法により評価した。水溶液中での分子会合性は、ネイティブ電気泳動により評価した。親油性・疎水性および生体成分に対する結合親和性は、HPLC 法により評価した。細胞膜に対する分子挙動は、リン脂質膜結合プレートと比色検出からなる評価法により解析した。タンパク質に対する分子挙動は、血清アルブミンやカゼインなどをモデルタンパク質とした電気泳動法により解析した。
【結果】渋味強度は TF3 が最も高く、次いで EGCg、RA、TF1 の順であった。CA、EGC、Que の渋味強度は他のポリフェノールに比べて著しく低かった。細胞膜透過性は Que、CA、TF1 が高く、渋味強度の最も高い TF3 の細胞膜透過性は確認できなかった。両親媒性を備えたポリフェノールは、タンパク質とリン脂質膜に対する結合親和性が他のポリフェノールに比べて比較的に高く、渋味強度が高く細胞膜透過性が低い傾向を示した。分子会合能は渋味強度の特に高い TF3 と EGCg のみで確認できたが、細胞膜表面への蓄積は TF3 と EGCg に加え RA でも確認できた。渋味強度の低いポリフェノールはリン脂質膜への親和性が高くても、細胞膜表面への蓄積は確認できなかった。タンパク質結合能は一定の疎水性を備えたポリフェノールにおいて認められ、渋味強度の結果とは一致しなかった。強いタンパク質凝集能は TF3 と EGCg のみに認められ、渋味強度の結果と一致した。以上より、強い渋味を呈するポリフェノールは、(1)両親媒性を備えること、(2)細胞膜透過性が低い(ない)こと、(3)分子会合能を有すること、(4)リン脂質膜に結合能を有し膜表面に蓄積すること、(5)タンパク質凝集能を有することが強く示唆された。これらの分子特性のいずれかが欠損するか親水性・疎水性が強調されると、渋味の減弱や苦味の増強が生じ、ポリフェノールごとに異なる味質特性が備わるものと推察される。

Polyphenol, Astringency, Molecular characterization

発表責任者：石井剛志（ishii_t@nutr.kobegakuin.ac.jp）

講演番号：2A13a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A13 会場

梅抽出液の美白効果及び抗酸化活性

Whitening effect and antioxidant activity of ume extracts

○本間 知夫[1]、須永 奈央[1]、中里 柊[1]、地下 まゆみ[2]([1]前橋工科大生物工学、[2]大阪大谷大教育)
○Tomoo HOMMA[1], Nao SUNAGA[1], Syu NAKAZATO[1], Mayumi JIGE[2] ([1]Maebashi Inst.Techol., [2]Osaka Ohtani Univ.)

【目的】当研究室では青梅をホワイトリカーに漬けた液(以下、梅抽出液と表記)を利用した自家製化粧水の機能性に関する研究を行っており、昨年度の大会では、梅抽出液及びその希釈液(梅抽出液を水と 5：4 の割合で混合・希釈)はいずれも高いチロシナーゼ阻害率を示したこと、美白効果成分は品種や成熟と関係があること、ゲル濾過分画から美白効果成分の分子量は 140 前後であることを報告した。本研究では、美白効果成分が青梅のどの部位に存在しているか、美白効果以外の機能性として抗酸化活性を、そして総ポリフェノール含有量について調べることを目的として実施した。
【方法】＜材料＞白加賀、南高の青梅果実を、6 月上旬と中旬に梅農家(群馬県高崎市箕郷町)よりそれぞれ 2 kg ずつ採取し、1 kg は青梅果実のまま、別の 1 kg は果肉と種子に分け、それぞれホワイトリカー1.8 L に浸けた。1 ヵ月後及び 3 ヵ月後に果実・果肉・種子を取り出し、濾過して得られた液を梅抽出液試料とした。
＜美白効果の測定＞メラニン合成酵素であるチロシナーゼの活性に対する各試料を添加した場合の阻害率を調べ、美白効果として評価した。なお、既存の美白成分としてよく利用されるコウジ酸を対照とした。
＜抗酸化活性の測定＞DPPH を用いたラジカル消去活性能を調べて消去率を求め、その消去率に等しい各試料 1 mL 当たりの Trolox 量(μmol-Trolox/mL)を求め、抗酸化活性とした。
（総ポリフェノール含有量の測定）フォーリン・チオカルト法により各試料 1 mL 当たりの没食子酸量(μg-GAE/mL)を求め、総ポリフェノール含有量とした。
【結果・考察】梅抽出液は約 90%の阻害率という高い美白効果を示し、果肉よりも種子の抽出液の方が高かった。そして加熱により種子の抽出液の美白効果が下がった。種子中には青酸配糖体であるアミグダリンが多く含まれ、加工や加熱により分解して揮発性物質であるベンズアルデヒド(以下、BAL と表記、分子量 106.12)が生成されることが知られている。梅酒に含まれる BAL の量は 9～16 ppm と報告されているため、ホワイトリカーで BAL を 0.1～50 ppm に希釈・調製した液の美白効果を調べたが、阻害率は低く、BAL は美白効果成分の一部ではあるが、主要な成分ではないと思われた。また、各試料の抗酸化活性は 0.7～2.5(μmol-Trolox/mL)であり、総ポリフェノール含有量との間には正の相関が見られた。
【謝辞】青梅果実を提供して下さった神澤農園・神澤文明氏に感謝致します。

Prunus mume, whitening effect, antioxidant activity

発表責任者：本間知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2A13a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A13 会場

6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate induces aldehyde dehydrogenase via Nrf2/ARE pathway in HepG2 cells

○Sihao YUAN, Yasukiyo YOSHIOKA, Tomoya KITAKAZE, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

[Objective]

In the body, alcohol dehydrogenase rapidly converts ethanol to its toxic metabolite, acetaldehyde, which is further metabolized to non-toxic acetic acid by aldehyde dehydrogenase (ALDH). 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC) is a bioactive ingredient in Japanese wasabi, and has been known to possess various notable physiological functions such as anti-oxidative and anticancer effects. However, effects of 6-MSITC on alcohol metabolism still remain unclear.

[Methods]

HepG2 cells were cultured and treated with 6-MSITC at various concentrations for 48 h to determine the cell viability by MTT assay. Then, ethanol cytotoxicity with or without 6-MSITC treatment was examined by MTT assay. ALDH activity was measured after treatment with 6-MSITC to HepG2 cells at different concentrations for different times. ALDH activity was measured in the post mitochondria and mitochondria fractions, respectively. Furthermore, heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase 2 (SOD2), cytosolic ALDH1A1 and mitochondrial ALDH2 as well as the translocation of nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2) to nucleus were detected by western blot. HepG2 cells were transfected with 30 nM Nrf2-specific siRNA or control siRNA. After 24 h of transfection, the cells were treated with 6-MSITC for 48 h followed by western blot to detect ALDH1A1 and ALDH2 protein expression.

[Results]

6-MSITC did not show toxicity to HepG2 cells by 20 μM. 6-MSITC inhibited ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. This compound increased total ALDH activity in both time- and dose-dependent manners, and specifically enhanced ALDH2 activity in the mitochondria fraction dose-dependently. Furthermore, 6-MSITC stimulated the expression levels of HO-1, SOD2 and ALDH2 accompanied by the translocation of Nrf2 to nucleus, while failed to affect ALDH1A1 expression level. 6-MSITC-induced ALDH2 expression was significantly decreased after Nrf2 knockdown, indicating that Nrf2 regulates ALDH2 expression. Therefore, 6-MSITC is possible to promote alcohol metabolism in hepatocytes.

6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate, Aldehyde dehydrogenase, Nrf2

講演番号：2A13a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A13 会場

酵素合成グリコーゲンの認知機能低下抑制効果と大脳皮質のメタボローム解析

Effects of enzymatically synthesized glycogen on cognitive function and metabolome analysis of brain cortex

○嶋 七海[1]、片山 茂[1,2]、市川 紗貴[1]、加藤 和子[3]、古屋敷 隆[3]、三谷 塁一[1,2]、中村 宗一郎[1]（[1]信州大農、[2]信州大先端領域、[3]江崎グリコ（株））
○ Nanami SHIMA[1], Shigeru KATAYAMA[1,2], Saki ICHIKAWA[1], Kazuko KATO[3], Takashi FURUYASHIKI[3], Takakazu MITANI[1,2], Soichiro NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. ICCER, [3]Ezaki Glico Co., Ltd.)

【目的】酵素合成グリコーゲン（Enzymatically Synthesized Glycogen；ESG）は免疫賦活効果や抗肥満効果など優れた生理機能を有し、腸内では食物繊維様に作用することが明らかとなっている。また近年、ESG の長期摂取はマウスのモーリス水迷路試験において、記憶保持力の向上効果が報告されている。そこで本研究では、老化促進モデルマウス SAMP8 を用いて ESG 長期摂取の認知機能低下抑制効果を検証するとともに、作用機序の解明を目的として、糞中細菌叢解析、および大脳皮質のメタボローム解析を行った。
【方法】SAMP8（雄性および雌性、15 週齢）を 2 群に分け、コントロール群には AIN-93M 食を、試験群には ESG を 6%含む試験食（コーンスターチの一部を ESG に置換）をそれぞれ自由摂取させ、25 週間飼育した。飼育期間中は毎週、体重と摂餌量を測定した。認知機能は、試験開始から 24 週間後に、バーンズ迷路試験と受動的回避試験を行い評価した。解剖前日の糞を採取し、T-RFLP 法により糞中細菌叢解析を行った。解剖後、採取した大脳皮質を用いてメタボローム解析を行った。
【結果】飼育期間中、コントロール群と ESG 群において、体重および摂餌量で顕著な差は認められなかった。バーンズ迷路試験では、雌雄ともに ESG 摂取群においてコントロール群と比較して、逃避箱への到達時間の短縮が認められた。特に、雄性 ESG 群では、逃避箱のあった分画滞在時間が顕著に増加した。一方、受動的回避試験においては、雄性 ESG 群はコントロール群と比べて変化が認められなかったのに対して、雌性 ESG 群では、再生試行の反応潜時がコントロール群よりも延長することが示された。糞中細菌叢解析を行った結果、雄性 ESG 群においては顕著な変化は認められなかったのに対して、雌性 ESG 群では *Bacteroidales* 目や *Clostridiales* 目の細菌群がコントロール群よりも増加した。次に、雌性マウスの大脳皮質を用いてメタボローム解析を行ったところ、ATP および ADP において顕著な変化が認められ、ESG 群ではコントロール群と比較して、アデニレートエネルギーチャージ（AEC）が低下することが示された。AEC は細胞内のエネルギー状態を示す指標であり、ESG 摂取群の大脳皮質では、ATP 生成が停滞することなく、効率よく亢進していることが示された。

Enzymatically synthesized glycogen, SAMP8, matabolome analysis

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A13a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A13 会場

食品機能成分によるトランスサイレチンの安定化と加齢性疾患に対する有効性の検討

Effect of functional food compounds on transthyretin stabilization and age-related diseases

○谷本 暁、奥田 真友美、NongQuynh Nga、松原 主典（広島大院・教育）
○Aki TANIMOTO, Mayumi OKUDA, Nga NONGQUYNH, Kiminori MATSUBARA (Hiroshima Univ.)

【目的】健康寿命の延伸のため、加齢に伴う疾病のリスクを下げる食品機能成分が注目されている。加齢に伴う疾病の発症や老化にはさまざまな要因があるが、我々はアミロイド形成タンパク質の 1 つであるトランスサイレチン（transthyretin: TTR）に着目して研究を進めている。TTR はチロキシンやレチノール結合タンパク質を輸送する機能に加え、脳内のアミロイドβ（amyloid beta: Aβ）を排出することからアルツハイマー病（AD）との関連性において、近年急速に注目されている。また、TTR 自身がアミロイドを形成し老化に関与すること、さらにはうつ病との関連性も指摘されている。そこで、本研究では、TTR 安定化作用のある食品機能成分を探索すると共に、その有効性について検討した。

【方法】食品機能成分の TTR 安定化作用については、thermal shift assay（TSA）法を用いて検討を行った。TSA において熱安定効果を示した機能成分については、酸による TTR 変性への影響について電気泳動で評価した。また、正常 TTR よりも変性・凝集し易い TTR 変異体を用いて酸変性への影響についても同様に検討した。TTR の遺伝子発現への影響として、神経細胞モデル細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。TTR の安定化による生体内での効果については、機能成分を経口投与したマウスの行動科学試験により評価した。

【結果】食品機能成分の TTR 安定化作用について TSA 法で検討した結果、大豆イソフラボンの一種である daidzein とその代謝物である equol、リグナンの代謝物である enterolactone と enterodiol、ローズマリーに含まれる成分のカルノシン酸（CA）などに安定化作用が認められた。TTR の酸変性への影響についても、これらの成分のほとんどのものが安定化作用を示した。また、TTR 変異体の酸変性に対してもほぼ同様な安定化作用を示した。従って、これらの成分は TTR の変性を抑制し、アミロイド形成の進行を抑制する可能性が示された。一方、これらの機能成分の SH-SY5Y 細胞における TTR 遺伝子発現に対する影響は異なっていた。この作用の違いの生理的意義を明らかにするため、マウスへの経口投与を行い、行動科学試験による評価を進めている。また、老化への影響を検討するため長期投与実験も進める予定である。

Amyloid, Transthyretin, Polyphenol

発表責任者：松原主典（kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A13a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A13 会場

栽培中ダイズが有する機能性の日内リズム解析

Diurnal variation of functions in growing soybean

○西口 弥生、白石 翔太、佐伯 雄一、窄野 昌信、榊原 啓之（宮崎大学農）
○Yayoi Nishiguchi, Shota Shiraishi, Yuichi Saeki, Masanobu Sakono, Hiroyuki Sakakibara (Miyazaki Univ.)

【背景】動植物体内には広く生物時計が存在しており，それ故に，体内で見られる多くの生命現象が約 24 時間周期のリズムを刻んでいることが知られている。そこで，体内で刻まれているリズムが食品成分の体内への吸収量や体内で発揮される機能に及ぼす影響の探求が，近年，広く実施されている。ところが，栽培中の野菜や果物に含まれている成分や機能が刻むリズムに関する情報は未だ不十分である。本研究では，就眠リズムを刻むことが知られているマメ科植物の中からダイズを選択し，その機能性に及ぼす収穫時刻の影響を測定した。

【方法】主要なダイズ品種の 1 つであるフクユタカを長日環境下で栽培した（明期: ZT0-12 あるいは ZT0-14，暗期: ZT12-24 あるいは ZT14-24)。発芽 15 日よりインターバルレコーダーを用いて，10 分間隔で 7 日間，恒常的明期条件下で葉の挙動を撮影した。次に，発芽後 12 週目に，明期開始時および暗期開始時に葉および豆果（エダマメ）を採取し、抗酸化活性（DPPH ラジカル消去活性法)，イソフラボン含量（HPLC-PDA 法)，イソフラボンの生合成系を司っている C4H，IFS などの遺伝子の発現量（定量 RT-PCR 法）をそれぞれ測定した。さらに，宮崎大学木花キャンパスで露地栽培したダイズについても同様の試験を実施した。

【結果】ダイズ葉の日内の平均開葉時間は 11.9±0.1 時間と，明確な就眠リズムを刻んでいることを確認した。ダイズ葉が有する抗酸化活性は，明期開始時に比べ暗期開始時で有意に高値を示したことから，ダイズ葉の抗酸化活性は夕刻に比べ、朝方に高まる可能性が示唆された。一方，エダマメでも同様の試験を実施したが，朝夕共にエダマメ抽出物には DPPH ラジカル消去活性は見られなかった。ダイズに含まれる主要な機能性成分であるイソフラボン量は，朝方が夕刻に比して 4%微増していた。興味深いことに，イソフラボンの生合成経路を司っている二つの遺伝子（C4H，IFS）の発現量が，いずれも夕刻で顕著に低下していた。つまり，イソフラボンの生合成経路は明け方の時間帯に活性化している可能性があると考えた。現在，露地栽培したダイズの解析を進めている。

Soybean, diurnal rhythm, function

講演番号：2A13a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A13 会場

イソチオシアネート―リジン付加体の薬物代謝酵素発現への影響
Effect of the isothiocyanate-lysine adduct on the expression of drug-metabolizing enzymes
○中村 俊之[1]、加藤 陽二[2]、村田 芳行[1]、中村 宜督[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]兵庫県大・環境人間)
○ Toshiyuki NAKAMURA[1], Yoji KATO[2], Yoshiyuki MURATA[1], Yoshimasa NAKAMURA[1] ([1]Okayama Univ., [2]Univ. of Hyogo)

【目的】
イソチオシアネート（ITC）類は、アブラナ科植物などに含まれる含硫化合物であり、主に発がん予防効果が期待される食品成分である。その効果の発現機序として、ITC 類と生体内分子中のチオール基との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。一方、ITC 類はアミノ酸配列決定法であるエドマン分解にも用いられるが、これは ITC 類とアミノ基との反応を原理としている。生体内においても、ITC 類とタンパク質 lysine 残基との付加体が生成し、血液中に比較的長期間存在することが報告されている。しかしながら、生体内でのアミノ基付加体の形成とその意義に関する報告は極めて限られている。そこで本研究では、ベンジルイソチオシアネート（BITC）と培養細胞内タンパク質 lysine 残基の付加体形成を確認するとともに、BITC-lysine 付加体形成が解毒酵素遺伝子群の発現誘導に与える影響を調査した。
【方法】
マウス肝がん Hepa1c1c7 細胞株に BITC を処理し、BITC と lysine 残基の付加体形成を Western blotting により確認した。次に、BITC と Nα-Boc-L-lysine を反応させ、BITC-lysine 付加体の作製を行った。Hepa1c1c7 細胞株に BITC-lysine 付加体を処理し、heme oxygenase-1（HO-1）および NAD(P)H quinone oxidoreductase 1（NQO1）の遺伝子発現量を PCR 法により確認した。
【結果・考察】
BITC 処理した Hepa1c1c7 細胞株から、BITC 濃度依存的に lysine 付加体の形成が認められた。そこで、ITC 類の lysine 付加の意義を検討する目的で、BITC-lysine 付加体の作製を試みた。BITC と Nα-Boc-L-lysine を反応させ、脱保護処理後、HPLC で分取・精製することで、BITC-lysine 付加体を得た。得られた付加体を Hepa1c1c7 細胞株に処理し、PCR 法により遺伝子発現量の変化を検討したところ、BITC-lysine 付加体の濃度依存的に HO-1 の遺伝子発現量が上昇した。一方で、NQO1 の遺伝子発現量に変化は見られなかった。これらの結果から、BITC 処理により細胞内に形成される lysine 付加体は、ITC が有する効果の一端を担っている可能性が示唆された。

isothiocyanate, modification, function

講演番号：2A13p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A13 会場

マガキ（*Crassostrea gigas*）の成長周期と金属利用に関する研究

Growth cycle and trace metals utility in oyster

○吉城 由美子、宮野 紗希、石黒 未紗、本間 直人（石川県大食科）
○Yumiko Yoshiki, Saki Miyano, Misa Ishiguro, Naoto Honma (Ishikawa Univ.)

[目的]

世界中で商業的に養殖されるマガキ（*Crassostrea gigas*）は、海水温度が 25℃を超える 7～8 月を産卵期とする 1 年周期の生体リズムをもっている。産卵回復期に取り込まれる亜鉛や銅、マンガンなどの微量金属は活性酸素消去酵素をはじめとする多くの酵素の活性中心となるほか、様々な生理活性酵素の補酵素でもある。そこで、本研究では活性酸素消去酵素に着目し、マガキの成熟度と生体リズムの関係を明らかにすることを目的とした。マガキの成長周期に伴う組織別技量金属の取り込み量、抗酸化酵素活性、抗酸化酵素の mRNA 発現量について検討した。

[方法]

石川県七尾湾（2016 年）で採取した海水およびマガキ（10 個体/月）を試料とした。海水のクロロフィル含量（A664-750）は分子吸光係数（ε=0.08874）から算出した。中腸線部の組織観察は 10%ホルマリンおよびエタノールで固定後、HE 染色で行った。えら、マガキは貝柱周辺、中腸線に 3 分割して凍結乾燥した。試料の微量金属含有量（Zn、Cu、Mn、Se）を偏光ゼーマン原子吸光光度計で測定した。各部位ごとの SOD 活性、CAT 活性、GSH ペルオキシダーゼ活性を測定した。中腸線の SOD、CAT および GPx mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

[結果]

海水の微量金属濃度（Zn、Cu、Mn、）はおよびクロロフィル含量は年間を通してほぼ一定であった。養殖場海域の微量金属濃度はマガキの微量金属含有量は産卵回復期の 10 月に Zn（1.26 mg/g）と Mn（6.7 μg/g）が、続いて 11 月に Cu（33 μg/g）と Se（2.98 μg）が増加した。それに伴い、抗酸化酵素も産卵回復期の 10 月に SOD 活性、CAT 活性がそれぞれ増加した。産卵期には GSH ペルオキシダーゼ活性が最も減少した。抗酸化酵素活性の増減と金属含有量の推移ならびに成長周期が連動することから、酵素活性が生体リズムの段階を示すバイオマーカーになる可能性がある。

oyster, trace metal, antioxidant enzyme

発表責任者：吉城由美子（yoshiki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A13p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A13 会場

ピーナッツ薄皮抽出液の抗インフルエンザウイルス活性

Antiviral activity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extract against human influenza viruses

○渡邊 健[1]、マカウ ジュリアン ジェンビ[1]、田島 民雄[2]、西田 教行[1] ([1]長崎大院・医歯薬、[2]日本ピーナッツ協会)
○Ken WATANABE[1], Juliann Nzembi MAKAU[1], Tamio TAJIMA[2], Noriyuki NISHIDA[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]Japan Peanuts Association)

【背景・目的】毎年流行を繰り返すインフルエンザの制圧は社会的要請であるがタミフル等の既存の抗インフルエンザ薬に耐性のウイルスが既に出現しており,新たな抗ウイルス化合物の開発が望まれている。我々は様々な食品・植物の抗ウイルス活性とその活性成分同定について研究を進めており、ピーナッツに着目した。ピーナッツはラッカセイ(*Arachis hypogaea*)のマメ科の豆で、世界的に重要な油脂原料でもある。その薄皮には抗酸化、抗炎症、抗菌作用といった様々な生理活性が知られているが抗ウイルス活性については殆ど知られていない。本発表ではピーナッツ薄皮より作成した抽出液を用いてその抗インフルエンザウイルス活性と作用機序を検討した結果について報告する。

【実験方法】品種および加工方法が異なる各種ピーナッツ薄皮を用いエタノール抽出液を作成した。イヌ腎臓上皮細胞（MDCK）に段階希釈した抽出液とともにインフルエンザウイルス A/WSN/33 株を感染した。50%感染阻害濃度(IC50),50%細胞毒性濃度(CC50)を求め,培養上清のウイルス粒子量,抽出液中のポリフェノール含量を定量した。最も活性が高い抽出液について、作用機序の検討、様々な亜型のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性を評価した。

【結果・考察】調べた全てのピーナッツ薄皮に抗インフルエンザウイルス作用が認められた。薄皮の加工法により,単位重量あたりの抗ウイルス活性には差があり焙煎＝ブランチング>>湯浸け となり、最も活性の高い抽出液の IC50 値は 1.5ug/mL であった。ピーナッツの品種毎に抗ウイルス活性に大きな差はみられなかった。ピーナッツ薄皮抽出液は H1N1、H3N2 亜型の実験室株および 2009 年流行臨床分離株 H1N1pdm（2009）や B 型インフルエンザウイルスにも効果を示し、その作用機序はウイルス増殖サイクルの初期である可能性が示唆された。また、既存の抗インフルエンザ薬との併用により、抗インフルエンザウイルス作用は増強される相乗効果が見出された。今後活性成分の同定と作用機序の特定を進めて行く予定である。

influenza virus, peanut, antiviral activity

発表責任者：渡邊 健（kenw@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：2A13p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A13 会場

漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 が肌状態に与える影響検討

Effects of consuming *Lactobacillus plantarum* strain TK61406 isolated from pickles on skin condition.

○大矢 あゆ美、森下 美香（東海漬物）
○Ayumi OHYA, Mika MORISHITA (Tokai Pickling Co.,Ltd.)

【背景・目的】

厚生労働省の「平成 25 年国民生活基礎調査の概況」によると、便秘で悩まされている人は成人に多く、特に女性の方が多い。便秘になると肌荒れを感じる人もおり、便秘と肌の調子には関係があることが経験的に分かっている。また、便秘になると便の腐敗が進み、フェノール類などの有害物質が発生し、これらが血流を介して皮膚に蓄積し表皮に悪影響を与えるなど、科学的にも関係が明らかとなってきている。しかし、アンモニアなど他の腐敗産物が肌に与える影響についての知見は少ない。

我々は、漬物から分離した乳酸菌 1,000 株の中からプロバイオティクス効果を有する可能性がある *Lactobacillus plantarum* TK61406 （以下 TK61406）を見出した。これまでに、健常成人を対象に二重盲検ランダム化並行群間比較試験により、顔肌の目立つ毛穴数の有意な減少および便中のアンモニア濃度の有意な減少を確認した。そこで我々は、TK61406 およびアンモニアが肌状態に与える影響について詳細に検討することとした。

【方法】

① 正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞を TK61406 凍結乾燥生菌粉末にて処理し、24h 後 WST-1 法により細胞増殖能力を測定した。また、処理 24、48、72h 後に回収した RNA を用いて RT-PCR 法によりヒアルロン酸合成酵素 2（HAS2）の発現量を測定した。
② 正常ヒト成人表皮角化細胞に血中生理的濃度のアンモニア（17.6、29.4、47.0 μmol/L）を添加、24h 後 WST-1 法により細胞増殖能力を測定した。また、17.6 μmol/L アンモニアで 24h 処理後、回収した RNA を用いて RT-PCR 法により表皮細胞の分化マーカーである Keratin 10 の発現量を測定した。

【結果・考察】

① TK61406 は繊維芽細胞の増殖能力および HAS2 mRNA 発現を有意に増加させた。
② アンモニアは濃度依存的に表皮角化細胞の増殖能力を減少させ、低濃度のアンモニアは Keratin 10 mRNA 発現を有意に減少させた。

以上より、TK61406 はヒアルロン酸産生を促している可能性が示され、また血中アンモニアは表皮角化細胞の分化を阻害していることが示唆された。

Lactobacillus plantarum, skin condition, Probiotics

発表責任者：大矢　あゆ美（oya-ayu@kyuchan.co.jp）

講演番号：2A13p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A13 会場

セサモリンによる S2 細胞内タンパク質の変動解析

Proteomic analysis of S2 cells treated with sesamolin

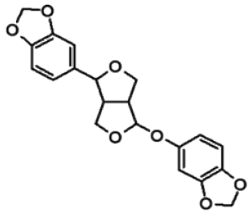
○成川 由希菜、勝崎 裕隆（三重大大学院）
○Yukina NARIKAWA, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【背景・目的】

ゴマ（*Sesamum indicum*）はゴマ科ゴマ属に属する一年生の草本で、その種子が食品として食べられている。古くから健康に良い食品として知られているが、その理由として高栄養であることの他に、ゴマに含まれるリグナン類が生物機能を示すことがあげられる。

当研究室では、これまでにリグナン及びリグナン配糖体の単離と構造解析、それらが有する抗酸化作用やショウジョウバエ胚細胞（S2 細胞）の増殖抑制作用についての研究が進められてきた。

過去の研究により、ゴマリグナンの一種であるセサモリンは、S2 細胞の細胞周期を調節することによる増殖抑制活性を持つことが示唆されたが、終濃度が 1 μM という低濃度の条件ではその活性を示さなかった。



セサモリン

そこで本研究では、細胞増殖抑制活性を示さない濃度に調整したセサモリンが、S2 細胞に与える影響を、2 次元電気泳動と質量分析装置を用いた S2 細胞内タンパク質の変動解析によって検証することを目的とした。

【方法・結果】

細胞数を 4.0×10^5 cells/mL に調整した細胞懸濁液を 2 枚の 90 mm シャーレに 10 mL ずつ播種し、一方には 10 μM のセサモリンを終濃度が 1 μM になるように添加、もう一方にはコントロールとして培地を同量添加した。それらを 48 時間培養した後、細胞を回収、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、細胞数を計測してからタンパク質を抽出しジチオスレイトール(DTT)でジスルフィド結合を還元した後、ヨードアセトアミドで修飾した。タンパク質濃度を算出した後、得られた 2 種類のサンプルをそれぞれ 2 次元電気泳動で分離した。1 次元目に等電点電気泳動を行い、2 次元目に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE、12.5%）を行った。その結果、セサモリン添加群において、11 個のスポットでタンパク質発現の低下が確認できた。

次に、上記のスポットを切り出し、トリプシンでゲル内消化を行い、その消化産物を、MALDI-TOF/TOF 質量分析装置で分析した。得られたデータをキイロショウジョウバエのデータベースと照合してタンパク質の同定を試みた。その結果、6 種類のタンパク質が同定された。従って、これらタンパク質の発現が低下したことが示唆された。

lignan, sesame, sesamolin

講演番号：2A13p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A13 会場

食品成分の活性値と作用機序の同時推定方法（第 2 報）

Simultaneous estimation method for the effect and action mechanism of food factor (2nd report)

○永浜 清子、山森 一人、江藤 望、西山 和夫、水光 正仁、榊原 陽一（宮崎大院・農工総合）
○Kiyoko NAGAHAMA, Kunihito YAMAMORI, Nozomu ETO, Kazuo NISHIYAMA, Masahito SUIKO, Yoichi SAKAKIBARA (Interdiscip. Grad. Sch. of Agric. and Eng., Univ. of Miyazaki)

【目的】我々は、細胞内のマーカータンパク質発現パターンに基づき人工ニューラルネットワークを用いて、同時に複数の体調調節機能の活性値を推定可能な評価法を開発してきた。昨年度は、ヒト T 細胞白血病ウイルス(HTLV-1)感染細胞 MT2 の増殖抑制効果をモデルとして、活性値の推定と同時にその作用機序の予測も可能な評価法を構築した。今回は、本評価法による詳細な解析を進めた内容について報告する。
【方法】本研究では、細胞内のマーカータンパク質発現パターンに基づき MT2 細胞増殖抑制効果を推定するため、拡張重み更新型自己組織化マップ(SOM)を用いた。40 種類の食品成分、薬剤成分、ならびに農産品抽出物をヒト肝がん由来 HepG2 細胞に添加し、12 種類の細胞内のマーカータンパク質を ELISA により測定した。一方、同成分ならびに抽出物について、MT2 細胞の増殖抑制効果を WST-8 により測定し、活性値とした。得られた食品及び薬剤成分の結果を、実際に発生しうる実験誤差を模倣したホワイトノイズを付加してデータを合成し、学習用データセットとした。農産品抽出物の結果は、ノイズを付加せず検証用データセットとした。次に、学習用データセットを用いて学習させ、マーカータンパク質発現量に基づいて自己組織化を行わせつつ、重みの一つとしてタンパク質発現量に応じた活性値を獲得させた。本法の信頼性評価のため、学習には用いなかった検証用データセットについて活性値を推定すると同時に既存法による実測値とを比較した。さらに、作用機序の予測も試みた。
【結果・考察】構築した拡張重み更新型 SOM は検証用データである農産品抽出物により評価したところ、感度 83.3%、特異度 100.0%で実測値と同程度の数値を推定することに成功した。次に本 SOM を用いて作用機序を予測するため、最終的に勝者ノードとなった成分情報を確認したところ、例えば、Fluvastatin や Lovastatin などの同じスタチン類や Delphinidin や Cyanidin などのアントシアニジン類のように似通った基本構造を有する成分は、比較的近い位置にクラスタリングされていた。また、活性を有する成分については文献情報を基に、アポトーシス誘導、細胞周期停止または、アポトーシス誘導と細胞周期停止のいずれかに割り当てられクラスタリングされていた。さらに、文献情報を有する抽出物は、その抽出物が割り当てられた競合ノードの近傍に、報告されている作用機序と似たような機序を示す成分が位置していた。以上の結果より、拡張重み更新型 SOM は活性値推定と作用機序予測に有用であることが示唆された。

self-organizing map, food functionality evaluation, action mechanism

発表責任者：永浜　清子（nagahama.kiyoko.w3@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A13p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A13 会場

大麦若葉末の摂取がヒト腸内細菌叢に与える影響の解析

Effects of young barley leaf powder on human gut microbiome

○須谷 尚史[1]、草場 宣廷[2]、眞志喜 桜[2]、鍔田 仁人[2]、古俣 麻希子[3]、立花 広太[3]、白髭 克彦[1]（[1]東京大学、[2]（株）東洋新薬、[3]TAK-Circulator（株））
○Takashi Sutani[1], Nobutaka Kusaba[2], Sakura Mashiki[2], Masahito Tsubata[2], Makiko Komata[3], Kota Tachibana[3], Katsuhiko Shiraihige[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]TOYO SHINYAKU Co., Ltd., [3]TAK-Circulator Corp.)

【目的】大麦若葉末は、イネ科オオムギ属に属するオオムギ（*Hordeum vulgare L.*）の若葉部を乾燥、微粉砕加工した淡緑～濃緑色の粉末であり、食物繊維やビタミン類を豊富に含有し、整腸作用なども確認されている。近年私たちは大麦若葉末摂取により肌荒れなどの皮膚状態の改善が生じることを見出したが、その作用機序については不明であった。本研究では、大麦若葉末摂取が腸内細菌叢の変化を引き起こすことにより皮膚状態の改善をもたらすという作業仮説に基づいて、その検証を目的としたプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間試験を行った。
【方法】ヘルシンキ宣言の精神に則り倫理委員会の承認を受け、被験者には試験内容を十分に説明した後に書面による試験参加の同意を得た上で実施した。被験者は肌荒れを主訴としてもつ健常成人女性（46.3±11.6 歳）で、1 日あたり大麦若葉末 6.0 g（大麦若葉末摂取群：n = 15）ないしプラセボ粉末 6.0 g（プラセボ摂取群：n = 13）を 8 週間にわたり摂取させ、摂取前後における皮膚状態の測定と腸内細菌叢の解析を行った。
【結果】大麦若葉末摂取群はプラセボ摂取群と比較して有意に頬の角層水分量の上昇を示し、大麦若葉末摂取によって皮膚状態が改善することが確認された。被験者の腸内細菌叢の組成を 16S rRNA 法によって解析したところ、プラセボ摂取群と比較して大麦若葉末摂取群で *Bifidobacterium longum* は有意に増加、Clostridiaceae 科の細菌は有意に減少し、Erysipelotrichi 綱で減少傾向であった。*Bifidobacterium longum* はビフィズス菌の一種であり、特に乳幼児の腸内で豊富に見出されるいわゆる善玉菌である。一方、Clostridiaceae 科には悪玉菌として知られるウェルシュ菌等が含まれている。以上の結果は、青汁摂取には腸内細菌叢をより健康的な状態へと遷移させる効果があることを強く示唆するものといえる。本研究の結果は、「大麦若葉末摂取による皮膚状態の改善は腸内細菌叢の変化を通じて引き起こされるものである」という仮説を支持するものであると考えている。

young barley leaf powder, gut microbiome, skin

発表責任者：須谷尚史（tsutani@iam.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A13p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A13 会場

青汁専用大麦若葉「むぎおう」の乳酸菌増殖活性成分の探索

The research of growth stimulator of lactic acid bacteria in "MUGIOH" young barley grass for aojiru

○神谷 智康、鍔田 仁人、青木 幸久、永瀧 達大 (株式会社大地の力研究所)
○Tomoyasu KAMIYA, Masahito TSUBATA, Yukihisa AOKI, Tatsuhiro NAGATAKI (Energy of Ground (Daichi-no-chikara) Laboratory Co., Ltd.,)

【目的】
大麦若葉末はイネ科オオムギ属のオオムギ（*Hordeum vulgare* L.）の出穂前の若葉部を刈り取った後、洗浄、乾燥、粉砕など、複数の工程を経て製造される淡緑色～濃緑色の粉末であり、主に青汁に配合されている。大麦若葉には食物繊維が豊富に含まれており、食物繊維は乳酸菌の増殖を促し腸内の細菌叢の改善に役立つことが報告されている。我々は青汁に適した品種を選定し、その大麦若葉を「むぎおう」と名付け、その成分と機能性について研究を行っている。そこで今回、「むぎおう」の乳酸菌増殖の活性成分を探索するため、*in vitro* で以下の検討を行った。
【方法・結果】
「むぎおう」の乾燥粉末を水・エタノールに溶解する画分（以下、水・エタノール溶解性画分）と溶解しない画分（以下、水・エタノール不溶性画分）に分画し、各画分の乳酸菌増殖に対する寄与を評価した。「むぎおう」の乾燥粉末からの収率に従い、各画分を MRS 液体培地に添加した。本培地を用いて乳酸菌（*Enterococcus Feacalis*）を所定時間培養した後、培養液中の菌数を PMA-PCR 法にて定量することにより乳酸菌増殖率を評価した。その結果、水・エタノール不溶性画分において乳酸菌増殖率が高く、「むぎおう」の乳酸菌増殖活性には水・エタノール不溶性画分が寄与していると考えられた。水・エタノール不溶性画分の主成分は不溶性食物繊維であることから、不溶性食物繊維に着目し次の検討を行った。
「むぎおう」の乾燥粉末から酵素処理により不溶性食物繊維と水溶性食物繊維を回収し、上記と同様の試験方法で、各食物繊維の乳酸菌増殖に対する寄与を評価した。その結果、不溶性食物繊維において乳酸菌増殖率が高く、「むぎおう」の乳酸菌増殖活性には不溶性食物繊維が寄与していると考えられた。
以上の結果より、「むぎおう」の乳酸菌増殖活性成分は不溶性食物繊維であることが示唆された。

young barley grass, insoluble dietary fiber, lactic acid bacteria

講演番号：2A13p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A13 会場

Lactobacillus rhamnosus GG 株の摂取が健常成人の排便および肌状態に及ぼす影響
Effects of ingesting *Lactobacillus rhamnosus* GG on defecation, fecal properties and skin condition in healthy adults.
○宮澤 賢司、原田 岳、依田 一豊、山崎 和幸、何 方、平松 優（タカナシ乳業（株）・商品研究所）
○Kenji MIYAZAWA, Gaku HARATA, Kazutoyo YODA, Kazuyuki YAMAZAKI, Fang HE, Masaru HIRAMATSU (Takanashi Milk Products Co., Ltd.)

【目的】
肌の状態は様々な外的な要因により影響を受けていることから、外部からのスキンケアも重要であるが、食生活も肌の状態に関連してくる。よって、様々な食品の摂取により体の中から肌の恒常性を保つことが可能だと考えられる。また、便秘状態は肌の状態が悪化すると古くから一般的に知られている。そこで、本試験ではプロバイオティクスである *Lactobacillus rhamnosus* GG 株（LGG 株）の摂取による排便および肌性状に及ぼす影響を検討した。

【方法】
便秘傾向および肌の乾燥を自覚している健常成人 89 名を対象に無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。試験期間は 4 週間とし、1 日 1 回、LGG 株（1.4×10^{10}cfu/day）、もしくはプラセボ食を摂取させた。被験者には毎日の排便状況および便性状アンケートを記録してもらった。肌の評価は、試験開始日と試験終了後に、機器計測および被験者によるアンケート調査を実施した。

【結果】
排便回数は両群に有意な差は認められなかったが、LGG 株群およびプラセボ群ともに試験終了 4 週後に有意に排便回数が増加した。排便量は 4 週間後に LGG 株群においてプラセボ群よりも増加する傾向が認められた。肌の状態は、上腕部の角層水分量がプラセボ群と比較して、LGG 群において有意に高まった。頬の経表皮水分蒸散量は両群間での差はみられなかった。試験前後の経表皮水分蒸散量はプラセボ群で変化がなかったものの、LGG 株群では試験終了後に有意に抑制していた。さらに、被験者のアンケートにより、試験終了後の肌の「うるおい」および「キメ」などが LGG 株摂取によりプラセボ群と比較して改善していた。以上より、LGG 株摂取により肌の状態を改善することが示唆された。

Lactobacillus rhamnosus GG, skin condition, probiotics

発表責任者：宮澤賢司（ke-miyazawa@takanashi-milk.co.jp）

講演番号：2A13p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A13 会場

Lactobacillus rhamnosus GG 株の摂取が健常成人の腸内および皮膚フローラに及ぼす影響
Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on gut and skin microbiota in healthy subjects.
○原田 岳、宮澤 賢司、依田 一豊、山崎 和幸、何 方、平松 優（タカナシ乳業）
○Gaku HARATA, Kenji MIYAZAWA, Kazutoyo YODA, Kazuyuki YAMAZAKI, Fang HE, Masaru HIRAMATSU (Takanashi Milk Products.)

【背景と目的】
Lactobacillus rhamnosus GG（LGG）株は、摂取することによりアトピー性皮膚炎や感染症予防効果など数多く報告されており、その作用機序の 1 つとして腸内細菌の変動が深く関わっていることが示唆されている。近年、種々の疾病と健常人の間には細菌叢の構成が異なることが見出されつつあるが、健常人へのプロバイオティクス投与による細菌叢への影響については報告が少ない。本研究では、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験により LGG 株を健常な成人に摂取した際の腸内および皮膚細菌叢へ与える影響について次世代シーケンサーを用いて調べることを目的とした。
【方法】
健康成人 89 名（プラセボ群 44 名、LGG 株群 45 名）を対象に LGG 株群には 1.4×10^{10}cfu/g を含む顆粒食品を、プラセボ群は菌抹をマルトデキストリンで置き換えた顆粒食品を 1 日 1 包、4 週間摂取していただいた。試験開始前、終了後に排便および肌性状を調べ、糞便およびスワブによる頬の皮膚を採取し、16s rRNA による細菌叢解析を実施した。
【結果】
腸内細菌叢のうち、LGG 株群の試験前後において *Enterobacteriaceae* 科の構成比は有意に減少し（$p<0.05$）、*Bacillus* 属を有意に増加させた（$p<0.01$）。プラセボ群において試験前後における有意な差は認められなかった。LGG 株を定量 PCR 法により測定した結果、LGG 株群では 29 名の被験者から検出され、これらの腸内細菌構成も同様に *Enterobacteriaceae* 科の減少（$p<0.05$）、*Bacillus* 属の増加（$p<0.01$）が認められ、この傾向が強くなった。また LGG 菌数と有機酸濃度の間で相関関係をみたところ、LGG 菌数と酪酸濃度の間に正の相関の傾向がみられた（$p=0.06$）。一方で LGG 株群のうち LGG 菌数が検出限界以下であった被験者においては有意な差は認められなかった。
以上のことから LGG 株の摂取と定着によって健常成人の腸内フローラの構成を変化させることが示唆された。

Lactobacillus rhamnosus GG, microbiota, probiotics

発表責任者：原田岳（g-harata@takanashi-milk.co.jp）

講演番号：2A13p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A13 会場

Screening for infection inhibitors of human norovirus GII.17 from food ingredients
○Li Li[1], Tomoki Shojima[1], Yi Lu[1], Yukie Katayama[1], Michio Suzuki[1], Hiroshi Kawakami[2], Koji Nagata[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoritsu Women's Univ.)

[Background and Objectives]

Human norovirus (HNV) is known as a cause of serious gastroenteritis in Japan. However, there is no approved vaccine or antiviral approach. Norovirus capsid is composed of a single major structural protein, VP1, which is subdivided into a shell domain (S domain) and a protruding domain (P domain). P domain forms viral spikes on the S domain and contains determinants for antigenicity and host-cell interactions. In human, the P domain binds carbohydrate structures of histo-blood group antigens (HBGAs), which are considered to be important for norovirus infection. Structurally, HBGAs compose five saccharide residues, α-1,2 fucose, α-GalNAc (α-*N*-acetylgalactosamine) or α-Gal (α-galactose), β-Gal, α-1,3 fucose, and GlcNAc (*N*-acetylglucosamine). Previous researches have shown that HNV P domains interact with the fucose residues in HBGAs to infect human. If this interaction can be inhibited, it is possible to prevent human norovirus infection. The objective of this study is to identify food ingredients that inhibit the interaction between HNV P domain and HBGAs.

[Methods and Results]

Recombinant P domain of a recent dominant HNV GII.17 Kawasaki 308 was used for this research. For the screening of inhibitors of the interaction between P domain and HBGAs from food ingredients, we monitored the fluorescence intensity of the complex of the P domain and 4-nitrophenyl α-L-fucopyranoside (PNP-fucose) in the presence or absence of food ingredients. By this method, we are now searching for food ingredients that could inhibit the interaction between HNV and HBGAs.

Human norovirus inhibitor, Food ingredients, Screening method

発表責任者：永田　宏次（aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A13p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A13 会場

わかめの摂取がヒトの便通と腸内環境に与える影響

Effects of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on human bowel movement and intestinal microflora

○吉永 恵子[1]、村上 桂[1]、丸谷 礼子[2]、小池田 崇史[3]、仲野 隆久[1] ([1]理研ビタミン(株)、[2](株)SOUKEN、[3]芝パレスクリニック)
○Keiko YOSHINAGA[1], Katsura MURAKAMI[1], Reiko MARUYA[2], Takashi KOIKEDA[3], Takahisa NAKANO[1] ([1]Riken Vitamin Co., Ltd., [2]SOUKEN Co., Ltd., [3]Shiba Palace Clinic)

【目的】
海藻は低カロリーでミネラル、ビタミンに富み、古来より食べられてきた日本食を代表する食材である。日本では約 50 種類の海藻が食べられているが、中でもわかめは味噌汁や酢の物の具として、広く食されている。これまでにわかめの機能性として我々のグループは、血圧降下作用やコレステロール低下作用などについて報告してきた[1)]。本試験では、わかめ摂取による便秘気味の女性への影響を検証することを目的とした。

【方法】
排便日数が 1 週間あたり 3～5 日の 20 歳～50 歳の便秘気味の女性 22 名を対象とした前後比較試験を実施した。試験食品として乾燥カットわかめ（ふえるわかめちゃん® 三陸）を用いた。この乾燥カットわかめを 1 日 4g、14 日間にわたり摂取させ、摂取前の 2 週間と摂取期間中の 2 週間について、排便調査（排便量・排便回数・排便日数・便性改善）、食事調査、アンケート調査を行った。また、乾燥カットわかめ摂取前と後に採便を行い、腸内細菌叢を T-RLFP フローラ解析法と次世代シークエンス法にて測定した。乾燥カットわかめの摂取方法は水戻しして摂取すること以外、摂取方法や回数に関しては特に指定しなかった。

【結果】
試験期間中に消化器系の副作用をもたらす可能性のある薬剤を服用した 1 名を除外し、21 名での解析を行った。非摂取期間と比較し、乾燥カットわかめ摂取期間の排便調査では、排便量、排便回数、排便日数で有意な改善が認められた。また、乾燥カットわかめ摂取前後の腸内フローラ解析ではビフィズス菌が有意に増加したことから、便通改善及び腸内フローラ改善の効果が示唆された。さらに、アンケート調査の結果、便通改善を自覚していることが明らかとなった。本試験期間中に有害事象に該当する報告はなかった。以上の結果から、わかめの継続摂取により腸内細菌叢に占めるビフィズス菌の割合が上昇し、排便状況が改善される可能性が示唆された。現在、ビフィズス菌のわかめの資化性の検討を実施中である。

1) *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2001; 30: 43-53.

Wakame, Bifidobacterium, Bowel movement

講演番号：2A13p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A13 会場

加熱処理乳酸菌素材「FK-23」の摂取が便秘傾向にある健常人の便通に与える影響

Effect of heat treated lactic acid bacteria preparation "FK-23" on stool in healthy volunteers.

○林 篤志[1]、坪内 芙美香[1]、岡森 万理子[1]、嶋田 貴志[1]、杉野 友啓[2] ([1]ニチニチ製薬株式会社、[2]株式会社 総合医科学研究所)
○ Atsushi HAYASHI[1], Fumika TSUBOUCHI[1], Mariko OKAMORI[1], Takashi SHIMADA[1], Tomohiro SUGINO[2] ([1]NichiNichi pharmaceutical co.,ltd., [2]Soiken Inc.)

【目的】我々はこれまでに乳酸菌の一種である *Enterococcus faecalis* を加熱処理した独自の標品である「ＦＫ-２３」が様々な機能性を有することを報告してきた。その一つに便通の改善効果があることが確認されている。本研究では「ＦＫ-２３」の腸内環境への影響、便通改善効果について、用量依存性および作用機序を明らかにすることを目的として実施した。
【方法】本試験は、事前に試験の主旨や内容を説明し、同意の得られたボランティアにて実施された。自己申告で排便回数が週に 3～5 回で便秘傾向にある、20 歳から 65 歳の健常な男女 72 名を対象に、「ＦＫ-２３」を 2 週間摂取することによる整腸作用（便通改善効果）について、プラセボランダム化二重盲検並行群間比較試験にて検討した。試験開始前の排便記録及び T-RFLP 法による腸内細菌叢の検索結果より排便回数及び腸内細菌叢内の *Bifidobacterium* 群の割合が均等となる様に被験者をプラセボ群、低用量群、中用量群および高用量群の 4 つの群に分け、プラセボ群以外のそれぞれの群に 0.025g、0.075g および 0.25g の「ＦＫ-２３」含有食品を連日 14 日間摂取させた。摂取開始前および摂取開始 2 週間目に専用のキットにて採便を行い、T-RFLP 法およびメタゲノム解析にて菌叢検索を行った。排便状況の変化は、事前に配布した排便日誌に被験者が記入した状況により評価を行った。評価項目は排便回数、排便日数、便性状、排便後感覚、便臭、排便量、便の色、排便の容易さ、放屁の頻度および腹部状況の計 10 項目とした。
【結果】72 名のうち 1 名が自己都合にて脱落となった。また、試験食の摂取開始が遅れた 1 名を第三者有識者の判断により除外し、解析対象者は 70 名となった。排便記録における全ての項目についてどの群においてもプラセボ群と比較して有意な差は見られなかった。しかし、探索的解析において高用群の経時変化において排便日数が 7 日／週であった人数の増加、便性状が良くなかった人の排便回数の増加、便臭や便の色が良くなかった人の排便回数の増加が見られ、「ＦＫ-２３」が整腸作用を有する可能性が示唆された。 腸内細菌叢検索においては、T-RFLP 法およびメタゲノム解析のいずれにおいても腸内細菌叢の有意な変化を示唆する結果は得られなかった。
【考察】プラセボ群と「ＦＫ-２３」投与群との間には有意な効果は認められなかったが、飲用前後での便通改善の傾向は認められた。「ＦＫ-２３」は加熱処理菌体であるため、生菌と比較して排便状況や腸内細菌叢に対し、緩やかな影響を示した可能性が考えられた。今後はより長期間の飲用における有効性指標の変化について検討を行う。

Lactic acid bacteria, Intestinal environment, Intestinal microbiota

講演番号：2A13p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A13 会場

ダイズ難消化性タンパク質の腸管バリア増強効果

Enhancement of intestinal barrier function by soybean resistant protein

○荻田 佑[1]、上野 豊[2]、梅澤 公二[1]、石黒 貴寛[3]、下里 剛士[1,4]([1]信州大バイオメディカル研、[2]信州大農、[3]旭松食品（株）研究所、[4]信州大菌類微生物セ)
○ Tasuku OGITA[1], Yutaka UYENO[2], Koji UMEZAWA[1], Takahiro ISHIGURO[3], Takeshi SHIMOSATO[1,4] ([1]IBS., Shinshu Univ., [2]Agr., Shinshu Univ., [3]Food RC., Asahimatsu Foods Co., Ltd, [4]CFMD., Shinshu Univ.)

【背景・目的】

近年、腸管バリアの破綻は、生活習慣病や炎症性腸疾患などの発症・増悪に関与することが指摘されている。また、腸管バリア機能の強化は疾病の予防において重要であることから、腸内環境は腸内細菌叢の構成の違いで大きく変化し、腸管バリアの破綻にも関係することが明らかとなってきた。とくに演者らは、ダイズ難消化性タンパク質（SRP）の生体調節機能に注目し、SRP の腸管バリア機能増強効果と腸内細菌叢に及ぼす影響について調査することを目的にした。

【方法】

SRP は大豆タンパク質のペプシン・パンクレアチン連続処理後の沈殿画分として調製した。C57BL/6 雌性マウス（6 週齢）を 14 日間、SRP 添加飼料（SRP, AIN-93G 95%+SRP 5%）或いは SRP 無添加飼料（Cont, AIN-93G）で飼育した後、盲腸組織および盲腸内容物を採取した。盲腸組織は抗菌ペプチド遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した。さらに、盲腸内容物の 16SrRNA 遺伝子を用いて次世代シーケンサーで得られた 16SrRNA 遺伝子(V3-V4 領域)配列データを QIIME で解析し、盲腸内細菌叢構成を調べた。

【結果】

盲腸組織の Reg3γ遺伝子発現は Cont と比較して SRP で有意に増加した。盲腸内細菌叢のα多様性（Phylogenetic diversity whole tree index）は Cont と比較して SRP で増加する傾向であり、β多様性も変化していた。また、Deferribacteres 門と Proteobacteria 門の占有率が有意に減少し、Deferribacteres 門の主要 OTU である De novo 9294 は *Mucispirillum* と同グループに属し、Proteobacteria 門の主要 OTU である De novo 11868 は *Desulfovibrionacease* と同グループに属していた。さらに Linear discriminant analysis effect size 解析(LDA スコア≦3)の結果、Cont と比較し、SRP で有意に増加した OTU は Bacteroidetes 門 9 OTU と Firmicutes 門 6 OTU であった。

【考察】

SRP 摂取は盲腸組織の Reg3γの発現増加を介して腸管バリア機能を増強することが示唆された。また、SRP の摂取は盲腸内細菌叢の多様性を増加するとともに、Deferribacteres 門と Proteobacteria 門の占有率を特異的に減少する一方、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の一部の細菌の占有率を特異的に増加することで、腸内環境の改善に寄与することが示唆された。

soybean resistant protein, intestinal barrier, cecal microbiota

講演番号：2A13p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A13 会場

時間栄養学的解析による水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響

Effects of dietary fiber inulin on mice gut microbiota with chrono-nutrition analysis.

○千々岩 樹佳[1,2]、丸山 徹[1,2]、細川 正人[3,4]、柴田 重信[5]、竹山 春子[1,2,3]([1]早大・先進理工・生医、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大・ナノライフ創新研、[4]JST・さきがけ、[5]早大・先進理工・電生)
○Rieka CHIJIIWA[1,2], Toru MARUYAMA[1,2], Masahito HOSOKAWA[3,4], Shigenobu SHIBATA[5], Haruko TAKEYAMA[1,2,3] ([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [4]PRESTO, JST, [5]Dept. Electrical Eng. Biosci., Waseda Univ.)

多くの生物の腸内には多種多様な細菌が存在し、宿主の様々な生理的機能と相互に影響する。健常状態では腸内細菌叢が一定のバランスを保っており、このバランスを維持することが健康維持に有効である。食事は腸内環境の制御因子の一つとされており、食事成分により腸内細菌叢の組成や機能活性を変化させることが可能である。また食事は体内時計の制御にも関わっているため、摂取する時間も重要である。近年では、どのような食事成分をいつ摂取するとヒトの健康や生活習慣病などの疾患予防につながるのか検証する時間栄養学的解析が重要視されている。近年の研究より、食事成分による腸内細菌叢変動が宿主の体内時計に影響することが示唆された。しかしながら、腸内細菌叢と宿主の体内時計の関係性について得られている情報は少ない。よって本研究では、腸内細菌の発酵基質として利用される食物繊維イヌリンを用いて、マウス腸内細菌叢へ与える影響を時間栄養学的視点より評価した。

研究手法として、12:12 明暗サイクル（明期開始時刻= 8 AM、暗期開始時刻= 8 PM）の条件下でマウス（ICR、6 終齢、雄）を飼育した。コントロール群としたセルロース食（普通食に 5%セルロース添加）とイヌリン食（普通食に 5%イヌリン添加）を 2 週間摂取させ、腸内細菌叢データやメタボローム情報取得を行なった。セルロース摂取群とイヌリン摂取群での給餌は、朝夕食、朝食、夕食の 3 設定を行った。腸内細菌叢データは、糞便からの DNA 抽出後、Miseq を用いた 16S アンプリコンシークエンシング（V3-V4）により得られた配列情報をもとに、腸内細菌叢組成解析や系統アノテーションなどの腸内細菌叢解析を行なった。また、盲腸内容物を用いて pH 測定を行い、有機酸の同定と濃度測定を行った。

本研究の結果、これらの群間において腸内細菌叢の変動比較を行なったところ、イヌリン群特有で変動する腸内細菌叢が見られた。また、給餌タイミングを変えたことでイヌリンの腸内細菌叢に与える影響が変化することも示唆された。このように、イヌリンの成分と、その摂取時間の違いの相乗効果により、腸内細菌叢の変動に影響を与えられることが示唆された。また、その腸内細菌叢の変動によって宿主に有益な有機酸や短鎖脂肪酸の産生に繋がる可能性が示された。これらの結果より、本研究で行なったマウスモデルでのイヌリン介入実験では、腸内細菌叢解析から時間栄養学的知見も得られた。本研究のような、時間栄養学をもとに腸内細菌叢を介した解析を行うことで、様々な生活習慣病などの疾患予防につながる知見が得られるのではないかと期待できる。

gut microbiota, Inulin, chrono-nutrition

発表責任者：千々岩樹佳（rieca.chijiiwa@asagi.waseda.jp）

講演番号：2A13p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A13 会場

高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与が回腸遺伝子発現に及ぼす効果
Effects of administration of wild yam propagules to high-fat loaded mice on their ileal gene expression

○篠崎 文夏[1]、亀井 飛鳥[1]、嶋田 耕育[1]、安岡 顕人[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]（[1]KISTEC、[2]東農大総研、[3]東大院農）
○ Fumika SHINOZAKI[1], Asuka KAMEI[1], Kosuke SHIMADA[1], Akihito YASUOKA[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3] ([1]KISTEC, [2]Tokyo Univ. of Agri., [3]Univ. of Tokyo)

【目的】自然薯 *Dioscorea japonica* の葉の根元にできる栄養繁殖器官であるムカゴは可食性であるが機能性に関する知見はない。我々は自然薯ムカゴにはポリフェノールなどが含まれ、抗酸化能が比較的高いことを見出し、生理的機能性を検証してきた。その結果、肝臓では自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷時に起こる脂質代謝の乱れを解消する方向に作用する可能性を示した。本研究では、回腸を解析対象とし、ムカゴの生理的機能性を遺伝子発現の特徴から検証した。
【方法】自然薯ムカゴは皮ごとスチーム加熱した後凍結乾燥し、粉末とした。ムカゴ粉末はα―コンスターチと置換で全体の５％となるように添加した。動物はマウス(C57BL/6、雄、3 週齢)を用いた。1 週間馴化後、試験食としてエネルギー比 10%の通常脂肪餌、脂質割合がエネルギー比 45%の高脂肪餌、および高脂肪餌に加熱ムカゴ粉末を添加した餌を与え 4 週間飼育し、採材した。採材前は 16 時間絶食とした。試験中の餌と水は自由摂取とした。摘出した回腸部分からトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによって遺伝子発現を解析し、変動遺伝子を得た。そこから、高脂肪の影響がムカゴ摂取によって改善方向に変動する遺伝子を抽出し、GOTERM に基づいた機能性分類を行った。
【結果】ムカゴ摂取は飼育期間中の体重増加や総摂取エネルギー量に影響しなかった。回腸の遺伝子発現は階層的クラスター解析の結果、各群でクラスターを形成しており、群によって遺伝子発現に特徴があると考えられた。改善変動遺伝子は、高脂肪負荷によって発現が上昇した遺伝子の中でムカゴ摂取によって発現が低下した遺伝子が 277 個、逆に高脂肪負荷によって発現が低下した遺伝子の中で自然薯ムカゴ摂取によって発現が上昇した遺伝子が 351 個あった。これらの改善変動遺伝子を GOTERM 分類したところ、代謝関連では脂質代謝や糖代謝、また、免疫関係では細胞接着や外因性刺激に対する応答などが多かった。
以上の結果から、高脂肪食と自然薯ムカゴの同時摂取は高脂肪食単独で摂取した際よりも腸管への高脂肪負荷の影響を軽減する方向に作用すると推察された。また、自然薯ムカゴの摂取の効果は代謝のみならず腸管免疫におよぶと考えられた。
本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

propagules, gene expression, ileum

講演番号：2A13p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A13 会場

コラーゲン由来トリペプチド X-Hyp-Gly による骨芽細胞分化促進作用

Collagen-derived X-Hyp-Gly-type tripeptides promote osteoblast differentiation

○多賀 祐喜[1]、楠畑 雅[1]、後藤 希代子[1]、服部 俊治[1]、船戸 紀子[2] ([1]ニッピ・バイオマトリックス研究所、[2]東京医科歯科大学)
○ YUKI TAGA[1], MASASHI KUSUBATA[1], KIYOKO OGAWA-GOTO[1], SHUNJI HATTORI[1], NORIKO FUNATO[2] ([1]Nippi Res. Inst. of Biomatrix, [2]Tokyo Med. Dent. Univ.)

【背景・目的】
コラーゲン加水分解物（CH）の経口摂取により hydroxyproline（Hyp）を含むジ・トリペプチドが血中に高濃度で検出されることが知られており、また、それらコラーゲン由来オリゴペプチドの生理作用も多数報告されている。最近我々は、ショウガ根茎由来酵素を用いることで、コラーゲンからの効率的な X-Hyp-Gly 型トリペプチドの生成を可能とし、また、その CH の経口摂取により他の CH に比べ X-Hyp-Gly の血中濃度が顕著に増加することを報告した（Taga et al., J. Agric. Food Chem., 2016)。他方、X-Hyp-Gly は水溶液中での加熱により簡単に環状ジペプチド cyclo(X-Hyp)へと環化することが明らかとなっており（Taga et al., J. Agric. Food Chem., 2017)、これら 2 種の特徴的なコラーゲン由来ペプチドの生理作用が明らかとなれば新たな活性ペプチドとして期待できる。そこで本研究では、X-Hyp-Gly および cyclo(X-Hyp)の骨芽細胞分化への影響を調査した。
【方法】
10%透析 FBS 含有α-MEM で維持培養したマウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 を β-glycerophosphate とアスコルビン酸で分化誘導し、その際、1 mg/mL のショウガ酵素分解 CH (GDCH) および熱処理 GDCH (H-GDCH ; 81℃、6 時間)、または 200 nmol/mL の合成ペプチドを添加した。NBT/BCIP 染色によりアルカリフォスファターゼ（ALP）活性、アリザリンレッド染色により石灰化、そして LC-MS により沈着層の全コラーゲン量と培養上清の I・III 型コラーゲン量、および細胞内へのペプチド取り込み量を評価した。
【結果】
X-Hyp-Gly を高含有する GDCH により骨分化マーカーである ALP 活性が上昇した一方、X-Hyp-Gly を cyclo(X-Hyp)へと変換させた H-GDCH では変化がなかった。また、各種 X-Hyp-Gly により ALP 活性の上昇および石灰化の促進が観察され、それらの効果は骨芽細胞分化促進作用が報告されている Pro-Hyp よりも高かった。一方、cyclo(X-Hyp)では ALP 活性の上昇は検出されなかった。分泌コラーゲン量についても、Ala-Hyp-Gly および Leu-Hyp-Gly によって、特に分化初期（培養 1 日）の沈着層において有意な上昇が観察された。細胞を破砕すると Pro-Hyp と同様、Ala-Hyp-Gly と Leu-Hyp-Gly も細胞内で検出され、これらペプチドが細胞内に取り込まれてから作用している可能性が示唆された。以上の結果より、X-Hyp-Gly 型トリペプチドが骨芽細胞分化促進作用を有することが示され、X-Hyp-Gly を高含有する GDCH は骨粗しょう症等の骨疾患を対象とした健康食品として期待される。

collagen, peptide, osteoblast

発表責任者：多賀祐喜（y-taga@nippi-inc.co.jp）

講演番号：2A13p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A13 会場

カルノシン酸は heme oxyganase-1 を誘導し軟骨変性を抑制する

Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxyganase-1 in human articular chondrocytes

○石飛 博之[1,2]、真田 洋平[3]、加藤 義雄[4]、生田 祥也[2]、柴田 紗知[5]、松原 主典[5]、安達 伸生[2]、味八木 茂[2,3]([1]京都産業大現代社会、[2]広島大院整形、[3]広島大病院、[4]産総研、[5]広島大院教育)
○Hiroyuki Ishitobi[1,2], Yohei Sanada[3], Yoshio Kato[4], Yasunari Ikuta[2], Sachi Shibata[5], Kiminori Matsubara[5], Nobuo Adachi[2], Shigeru Miyaki[2,3] ([1]Kyoto Sangyo Univ.Sociology, [2]Hiroshima Univ.Orthopedic, [3]Hiroshima Univ. Hospital, [4]AIST, [5]Hiroshima Univ.Education)

【目的】

近年、我々は抗酸化酵素 Heme oxyganase-1(HO-1)の抑制因子である Bach1 遺伝子を欠損したマウスを用いて変形性関節症(OA)抑制効果を報告した。Bach1 遺伝子欠損マウスの軟骨細胞では、HO-1 が恒常的に発現し、その結果、軟骨破壊酵素である Adamts-5,MMP-13 の遺伝子発現の減少やアポトーシス細胞の低下が観察された。これらのことから、HO-1 の活性化は OA の予防効果に繋がることが考えられ、HO-1 を活性化するといった報告がある抗酸化物質のカルノシン酸(CA)に注目した。CA はローズマリー等に含まれる抗酸化物質であり、Nrf2 を介し細胞保護作用があるとされる。そこで本研究では、CA が関節を構成する細胞に対し、関節保護作用があるか検討することを目的とした。

【方法】

ヒト滑膜、関節軟骨細胞に炎症性サイトカインである IL-1β と CA を同時に添加し、細胞における OA 関連遺伝子等の発現を RT-PCR、ウエスタンブロッティング法により検討した。マウスより関節軟骨組織を採取し、同様の処理を行い、軟骨基質であるグルコサミノグリカン(GAG)の 放出を GAG-loss-assay により定量した。また、CA を添加した軟骨細胞を用いて microRNA(miRNA)に対するマイクロアレイ解析を行った。CA 添加により、発現上昇の観察された miRNA の標的遺伝子を Target Scan により予測した。そして、予測された標的遺伝子の 3'UTR 側をルシフェラーゼ遺伝子の下流に繋いだベクターを HEK293T 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより評価を行なった。

【結果】

滑膜、軟骨細胞では IL-1β 添加により Adamts-5、IL-6、MMP-13 の発現は亢進したが、CA を同時に添加した場合 Adamts-5、MMP-13 の発現が抑制された。マウス関節軟骨組織を IL-1β、CA 存在下で培養した結果、CA 存在下では GAG の放出が抑制された。CA 添加を行なった軟骨細胞を用いて miRNA に対するマイクロアレイ解析を行なった結果、軟骨の恒常性維持に重要な役割を果たす miRNA-140 の発現上昇が確認された。Target Scan の結果 miRNA-140 は Bach1 を標的遺伝子としていることが予測され、ルシフェラーゼアッセイの結果、Bach1 を標的としていることが明らかとなった。これらの結果から、CA は IL-1β 誘導性の OA 様状況下において、関節を構成する細胞を保護する効果があることが確認された。そして、その作用機序として CA が軟骨の恒常性維持に重要な miRNA-140 を介し、HO-1 の抑制因子である Bach1 を制御することで HO-1 を活性化するという機序が新たに示唆された。

Carnosic acid, heme oxyganase-1, cartilage degeneration

講演番号：2A13p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A13 会場

マルトビオン酸は破骨細胞分化を抑制する
Maltobionic acid suppresses osteoclastogenesis

○西尾 彩花[1]、鵜飼 容子[2]、山口 青夏[2]、渡辺 章夫[3]、米澤 貴之[3]、禹 済泰[1]、末廣 大樹[4]、阿部 秀飛[4]、深見 健[4]、大西 素子[1,2]([1]中部大・応生化、[2]中部大院・応生、[3]中部大・生機研、[4]サンエイ糖化（株））
○ Ayaka NISHIO[1], Yoko UKAI[2], Haruka YAMAGUCHI[2], Akio WATANABE[3], Takayuki YONEZAWA[3], Je-Tae WOO[1], Daiki SUEHIRO[4], Shuto ABE[4], Ken FUKAMI[4], Motoko OHNISHI[1,2] ([1]Biological Chemistry, Chubu Univ., [2]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [3]Research Institute for Biological Function, Chubu Univ., [4]San-ei Sucrochemical Co., Ltd)

【目的】蜂蜜に含まれるマルトビオン酸は、グルコン酸にグルコースがα-1,4 結合した構造であり、糖質としての性質と、酸としての性質を併せ持っている。マルトビオン酸は、無機カチオンと安定な塩を形成する特徴を持ち、マルトビオン酸にカルシウム(Ca)がイオン結合したマルトビオン酸 Ca は、水に対する溶解度が極めて高く、体内への Ca 吸収を増進させ、大腿骨中 Ca 量を増加させることが確認されている。本研究ではマルトビオン酸による骨密度改善効果に関するメカニズムを解明するために、マルトビオン酸による破骨細胞分化に対する影響について検討したので報告する。
【方法】マウス単球／マクロファージ由来 RAW264 細胞を 4×10^3cells/well で 96 well plate に播種し、破骨細胞分化因子(RANKL)添加 30 分前にマルトビオン酸またはマルトビオン酸 Ca を加えて 72 時間培養した。培養後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を行い、TRAP 陽性で 4 核以上の多核細胞数を計測した。また、RAW264 細胞の細胞生存率は MTT アッセイにより決定した。マウス骨髄細胞は 8 週齢の DDY マウス大腿骨および脛骨から採取した。RANKL 添加 4 時間前にマルトビオン酸またはマルトビオン酸 Ca を加えて骨髄細胞を培養し、破骨細胞に分化誘導後、TRAP 染色を行い、多核細胞数を計測した。またウエスタンブロット法を用いて、マルトビオン酸またはマルトビオン酸 Ca の RANKL 刺激による破骨細胞分化シグナルに対する影響を調べた。
【結果・考察】 マルトビオン酸またはマルトビオン酸 Ca を加えて RAW264 細胞の分化誘導を行うことで、TRAP 陽性の多核細胞数が減少したことから、どちらの化合物も RAW264 細胞の破骨細胞への分化を抑制すると考えられた。また、これらの化合物は、未分化の RAW264 細胞の生存率にはほとんど影響を与えなかった。さらにマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化誘導系での検討では、マルトビオン酸またはマルトビオン酸 Ca を RANKL 添加前から加えて培養した試験系において、いずれも濃度依存的に破骨細胞数の減少が認められた。以上の結果より、マルトビオン酸による骨密度改善効果に関するメカニズムは、マルトビオン酸が分化初期過程での破骨細胞増殖を抑制したことが関与していると示唆された。

osteoclast, Maltobionic acid

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2A13p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A13 会場

骨芽細胞分化に対するブラジル産グリーンプロポリス由来化合物の作用

Effects of compounds isolated from Brazilian green propolis on osteoblast differentiation.

○小川 ゆり[1]、渡辺 章夫[2]、出口 有佑[3]、川上 俊成[3]、遠藤 ゆき[1]、バストス ジャイロ ケヌップ[4]、米澤 貴之[2]、禹 済泰[1] ([1]中部大応生、[2]中部大生機研、[3]中部大応生院、[4]サンパウロ大)
○Yuri OGAWA[1], Akio WATANABE[2], Yusuke DEGUCHI[3], Toshinari KAWAKAMI[3], Yuki ENDO[1], Jairo Kenupp Bastos[4], Takayuki YONEZAWA[2], Je-tae WOO[1] ([1]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ., [2]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [3]Graduate school of Bioscience and Biotech., Chubu Univ., [4]Univ. of Sao Paulo)

【目的】

骨の恒常性は、骨芽細胞と破骨細胞による骨のリモデリングが繰り返されることによって保持されている。しかし、破骨細胞による骨吸収量が骨芽細胞による骨形成量を上回るなどして、リモデリングのバランスが崩れると骨粗鬆症などの骨減少疾患が引き起こされる。我々は、骨粗鬆症などの予防・改善に有用な機能性表示食品の開発に繋がる可能性があるとして、ブラジル産プロポリス由来の化合物について骨芽細胞分化促進作用を評価した。その結果、ケイ皮酸誘導体である baccharin に骨芽細胞分化促進作用が見出されたのでここに報告する。

【方法】

マウス前骨芽細胞 (MC3T3-E1) にサンプルを添加して 6 日間培養し、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性を評価した。また、マウス前骨芽細胞 (MC3T3-E1) をアスコルビン酸とβグリセロホスフェートの存在下でサンプルを添加して 12 日間培養した細胞を固定後、アリザリンレッド染色することにより石灰化に対する作用を評価した。骨芽細胞分化促進作用が見受けられたサンプルについては、添加して 3 日間培養した細胞から Total RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法で mRNA の発現量を測定した。

【結果】

ブラジル産プロポリス由来のケイ皮酸誘導体である baccharin には、ALP 活性促進試験と ALP 染色の結果から ALP 活性の上昇作用が認められた。さらに、アスコルビン酸とβグリセロホスフェートの誘導条件下で baccharin を添加したところ、アリザリンレッドによって沈着したカルシウムが染色されたことから、骨芽細胞による石灰化促進作用も認められた。また、定量 RT-PCR 法で、骨芽細胞前期分化マーカーである ALP と、後期分化マーカーであるオステオカルシンの mRNA 発現量の増加が確認された。

【結論】

ブラジル産プロポリスに含まれる baccharin は骨芽細胞分化を促進させたことから、骨量増加作用が期待され、骨粗鬆症などの骨減少疾患に対する予防・改善に有用である可能性が示唆された。

Osteoblast, Brazilian green propolis, Osteoporosis

講演番号：2A13p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A13 会場

老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護機構及び関節軟骨保護効果の検討

Protective effect of bioactive compounds derived from sake cake on brain function and articular cartilage in senescence-accelerated mice.

○奥田 真友美[1]、柴田 紗知[2]、味八木 茂[3]、大久保 剛[4]、伊豆 英恵[5]、藤井 力[5,6]、松原 主典[1]（[1]広島大院・教育、[2]福山大・生命工学、[3]広島大病院・未来医療センター、[4]仙台白百合女大・健康栄養、[5]酒総研、[6]広島大院・生物圏）
○Mayumi OKUDA[1], Sachi SHIBATA[2], Shigeru MIYAKI[3], Takeshi OHKUBO[4], Hanae IZU[5], Tsutomu FUJII[5,6], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Fukuyama Univ., [3]Hiroshima Univ. Hospital, [4]Sendai Shirayuri Women's Univ., [5]NRIB, [6]Hiroshima Univ.)

【目的】発酵食品の一つである酒粕は多彩な機能成分を含んでいる。我々は酒粕の機能成分である *S*-アデノシルメチオニン（SAM）及びグリセロホスホコリン（GPC）の抗老化効果について、老化促進マウスを用いて検討を進めており、これまでに両成分の単独及び複合摂取による脳機能保護効果とその作用機構について本大会で報告してきた。本研究では両成分による脳機能保護効果の作用機構についてアミロイド形成タンパク質に注目して解析を行うと共に、膝関節への影響についても検討を行った。
【方法】実験動物には老化促進マウス（SAMP8）を用い、SAM や GPC は飲料に溶解し自由に経口摂取させた（対照群、SAM 群、GPC 群、SAM+GPC 群）。脳については、アルツハイマー病との関連が知られているアミロイドβ（amyloid-beta: Aβ）とトランスサイレチン（transthyretin: TTR）の沈着について、また炎症反応の指標となるミクログリア細胞について免疫染色を行い、脳組織の状態を評価した。膝関節についてはサフラニン O-ファストグリーン染色を行い、SAM や GPC の摂取による膝関節への影響を評価した。
【結果】脳での Aβの沈着については、全ての群で明確な差は見られなかった。一方、TTR は SAM や GPC を摂取した群で沈着の出現率が有意に少なく、沈着数についても SAM 群で少なくなっていた。また、TTR の沈着は脳血管の周辺組織で多く観察された。SAMP8 は老化が進むと血液脳関門（BBB）の透過性が増し、血漿成分の滲出を起こすことから、血液中に多く存在する TTR は BBB の機能低下により脳組織に漏れ出し沈着したと考えられた。このことから、SAM や GPC は脳血管を保護することにより BBB の機能低下を防ぎ、TTR 沈着を抑制する可能性が示唆された。さらに、脳の炎症マーカーであるミクログリア細胞の特異的抗体である Iba1 を用いて免疫染色を行った。その結果、SAM や GPC を摂取した群で活性化したミクログリア細胞の数が少なく、ミクログリア細胞の活性化が抑制されていた。さらに、TTR と Iba1 の蛍光二重染色では、TTR 沈着と活性化したミクログリア細胞が共存しており、TTR の沈着が炎症反応を誘発する可能性が示唆された。以上の結果から、SAM や GPC は脳血管を保護し、脳における TTR の沈着を抑制することで炎症の亢進による脳神経細胞死を抑制し、脳機能を保護することが示唆された。一方、膝関節については、GPC の摂取により関節軟骨組織の損傷が抑制されていた。SAM 群及び SAM+GPC 群については、現在検討を進めている。
本研究は SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

Sake cake, Brain function, Osteoarthritis

発表責任者：松原主典（kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A14a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A14 会場

Synthesis of 3-O-methylcyanidin and the stability of 3-O-substition of cyanidins

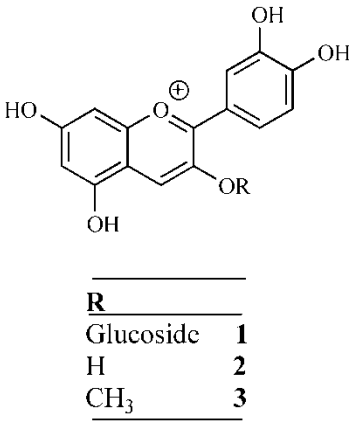
○Asmaa benyamin EL-Meligy[1,2], Takehiro Ishihara[1], Kin-ichi Oyama[3], Ahmed Mahmoud El-Nahas[2], Kumi Yoshida[1] ([1]Graduate School of Informatics, Nagoya University., [2]Faculty of Science, El-Menoufia University, Egypt., [3]Research Institute for Materials Science, Nagoya University.)

The purpose:

Anthocyanins are plant pigments being used for food colorant, as well as a dye for dye sensitized solar cell. The main drawback is their instability; they are very unstable in neutral and weakly acidic aqueous conditions. From the comparison of stability of glycosylated anthocyanins and its chromophore, such as 3-*O*-glycosyl cyanidin (**1**) and cyanidin (**2**), 3-*O*-glucosilation has been considered to increase the stability. To clarify this, we synthesized 3-*O*-methylcyanidin (**3**), and compare the stability of **1**, **2** and **3**. We also analyzed the effect of presence of co-pigments on the color and stability of pigment (Scheme 1).

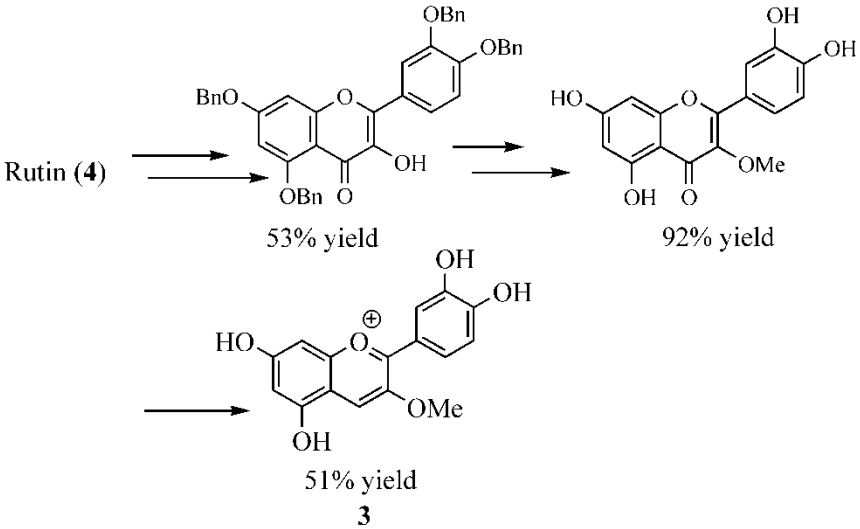
Method and Result:

1 was isolated from black soy bean (*Glycine max*). **2** was obtained by acidic hydrolysis of **1**. **3** was synthesized from rutin (**4**, Scheme 2). **1-3** were dissolved in aq. buffer solution of pH 1 and stored at rt in dark condition. UV-Vis Spectra were recorded and time-dependent decrease of absorbance was analyzed. In the strong acidic solutions **1** and **3** were very stable and the color was kept for more than two weeks, but the color of **2** was unstable and the absorbance was less than 20 % after two weeks. These results revealed that 3-*O*-substition plays a role in retarding decomposition of anthocyanin. Addition of co-pigment (1-10 eq. to each pigment) showed bathochromic shift of λvismax, but decrease in absorbance of λvismax was observed. The co-pigmentation effect of flavocommelin (**5**) was stronger than that of rutin (**4**).



R	
Glucoside	**1**
H	**2**
CH_3	**3**

Scheme1: Structure 3-*O*-substition cyanidins.



Scheme2: The synthesis of 3-*O*-methylcyanidin (**3**).

3-O-methylcyanidin, Stability, Co-pigmentation

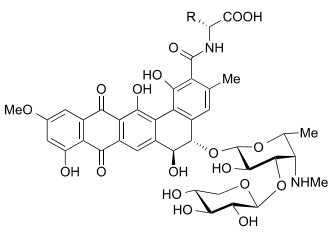
発表責任者：Asmaa Benyamin El-Meligy（asmaa_chem@info.human.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A14a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A14 会場

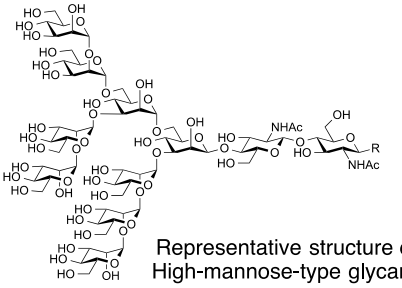
プラディミシンと高マンノース型糖鎖のオリゴ糖モチーフとの結合解析
Binding analysis of pradimicins with mannooligosaccharide motifs of high-mannose-type glycans
○渡邉 泰典[1]、中川 優[1,2]、山地 史哉[1]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1]([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]富山県大・生工)
○Yasunori WATANABE[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Fumiya YAMAJI[1], Yasuhiro IGARASHI[3], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Toyama pref. Univ.)

【目的】 放線菌由来のプラディミシン A (PRM-A) とその類縁体 (PRMs) は，ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の表層に存在する高マンノース型糖鎖に結合することで抗 HIV 活性を示すことから，糖鎖を標的とする前例のない抗 HIV 薬リードとして注目されている．しかしながら，PRMs がどのような構造の高マンノース型糖鎖を認識しているのかは明らかになっていない．そこで本研究では，高マンノース型糖鎖のマンノオリゴ糖モチーフを系統的に合成し，PRMs が高いアフィニティーを示す高マンノース型糖鎖構造を明らかにすることを目的とした．

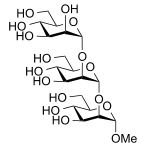
【方法・結果】 高マンノース型糖鎖は，還元末端の *N*-アセチル-D-グルコサミンの二糖に最大 9 個の D-マンノースで構成されるマンノオリゴ糖が結合した構造を有する．そこで，本マンノオリゴ糖の部分構造に対応する三～五糖 (**1-6**) を化学合成し，真菌マンナンとの結合競合試験および凝集試験によって PRM-A および PRM-FA1 に対するアフィニティーを評価した．その結果，両 PRM とも直鎖型オリゴ糖 (**1**) よりも二分岐型オリゴ糖 (**2-5**) に数十倍強く結合し，三分岐型オリゴ糖 (**6**) にはさらに強く結合することが明らかとなった．本結果より，PRMs は高マンノース型糖鎖の複数の非還元末端マンノース残基を同時に認識していることが示唆された．現在，三分岐型六糖 **7**, **8** の合成を進めており，その結合試験の結果も合わせて報告する．



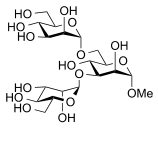
PRM-A : R = Me
PRM-FA1 : R = CH_2OH



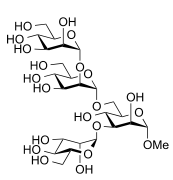
Representative structure of
High-mannose-type glycans



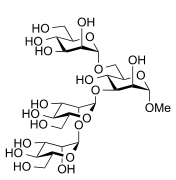
1



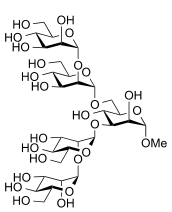
2



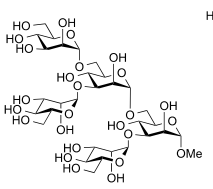
3



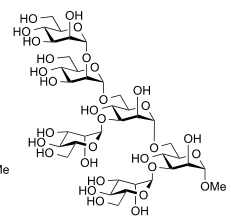
4



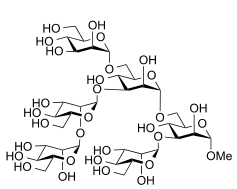
5



6



7



8

pradimicin, carbohydrate recognition, high-mannose-type glycan

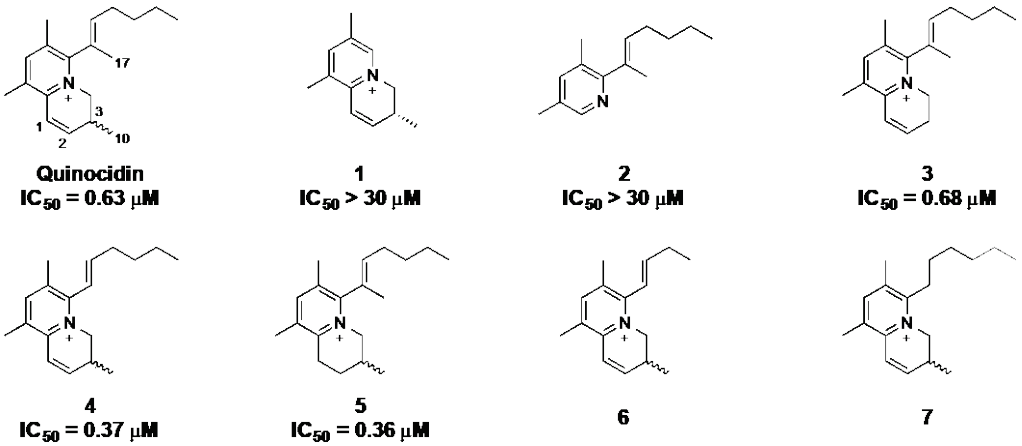
発表責任者：中川　優（yu@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A14a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A14 会場

Quinocidin のアナログ合成と細胞毒性評価
Synthesis and cytotoxicity evaluation of quinocidin analogs
○澤木 裕紀、中川 優、小鹿 一 (名大院・生命農)
○Yuki SAWAKI, Yu NAKAGAWA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】 放線菌由来の quinocidin は，3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有するユニークな天然物であり，HeLa-S3 細胞に対して毒性を示す (IC_{50} = 0.63 μM)[1]．我々は，本天然物の 3 位の立体配置が細胞毒性に影響を与えないことを明らかにしているが，詳細な構造活性相関は不明である．そこで本研究では，quinocidin のアナログ合成と細胞毒性評価を行い，本天然物の構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした．

【方法と結果】 3,5-Lutidine を出発原料として 5 種のアナログ (**1**~**5**) を合成し，HeLa-S3 細胞に対する毒性を評価した．その結果，アルケン側鎖をもたない **1** およびピリジニウム構造をもたない **2** は極めて低い毒性しか示さなかったことから，quinocidin の細胞毒性にはアルケン側鎖およびピリジニウム構造の両方が必要であることが明らかとなった．一方，10-demethyl 体 **3**, 17-demethyl 体 **4** および 1,2,3,4-tetrahydroquinolizinium アナログ **5** はいずれも quinocidin とほぼ同等の細胞毒性を示したことから，10 位および 17 位メチル基と 1, 2 位の二重結合は細胞毒性に重要ではないことが示唆された．現在，側鎖を短くしたアナログ **6** および **4** のアルケン側鎖の二重結合を飽和したアナログ **7** の合成も進めており，その細胞毒性試験の結果も合わせて報告する．



1) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, DOI: 10.1002/chem.201704729.

Antibiotic, Dihydroquinolizinium, Structure-activity relationship

発表責任者：澤木裕紀（sawaki.yuuki@a.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A14a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A14 会場

Kujigamberol 酸化誘導体の調製と活性評価
Preparation and activity evaluation of oxidized derivatives of kujigamberol
○高橋 穂乃香[1]、下田 希[2]、丸山 美紅[1]、越野 広雪[3]、大野 美紗[2]、木村 賢一[1,2] ([1]岩手大院総合科学、[2]岩手大農、[3]理研 CSRS)
○Honoka TAKAHASHI[1], Nozomu SHIMODA[2], Miku MARUYAMA[1], Hiroyuki KOSHINO[3], Misa OHNO[2], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]RIKEN CSRS)

【目的】Ca^{2+}超感受性遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を指標としたスクリーニングにより、久慈産琥珀から新規のラブダン型ジテルペノイド 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol (**1**)（kujigamberol と命名）[1] と、ドミニカ産琥珀から既知の 3-cleroden-15-oic acid (**2**) [2] などを単離した。**1** は分子内にヒドロキシ基を有し、**2** はカルボシキ基を有するが、**2** の生物活性の方が、**1** より YNS17 株に対してもラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3 細胞）の脱顆粒抑制活性に対しても強い活性を示す。一方で **1** は、モルモットに対し臨床薬のステロイドの約 5 倍の鼻づまり抑制活性を示している。そこで、**1** のヒドロキシ基をカルボシキ基に酸化することで、**1** の酸化誘導体が **1** より高活性が期待できると考え検討した。
【方法】**1** を pyridinium dichromate 5 当量で 3 時間、または 400 当量で 10 時間、それぞれ室温で酸化後、その生成物をジエチルエーテル抽出した後、逆相 HPLC（ODS、4.6×150 mm、75% MeOH+0.1% 酢酸）によって精製した。生成物の構造は、MS と NMR により同定した。活性は、YNS17 株と 0.3 M $CaCl_2$ を混合したプレートにサンプル 5 μl をスポットし、28℃で 3 日間の培養後に生じる生育回復活性を評価した。また、RBL-2H3 細胞での MTT アッセイによる細胞毒性を調べた後、IgE+DNP-BSA (Ag)、Thapsigargin (Tg), 並びに A23187 刺激における脱顆粒抑制活性を評価した。
【結果】10.0 mg の **1** から、15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-al (**3**) と 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-oic acid (**4**) をそれぞれ 5.4 mg（収率 55.1%）、5.8 mg（55.8%）で得た。YNS17 株に対する生育回復活性は、**4** は 0.31 μg/スポットまで生育抑制が認められたが、**3** は **1** の約 1/4 に低下した。また、RBL-2H3 細胞に対する細胞毒性は、**1** が IC_{50}=87.1 μM であるのに対し、**3** は IC_{50}=41.6 で増強したが、**4** は IC_{50}＞100 μM と細胞毒性が低下した。一方、RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制活性は、**1** が Ag、Tg、A23187 のそれぞれの刺激に対して IC_{50}＞50、=29.1、=24.9 μM であるのに対し、**3** はいずれの刺激においても 50.0 μM で認められず、**4** はそれぞれ IC_{50}＞50、=6.3、=20.5 μM だった。このことから、Tg、A23187 刺激ではカルボキシ基が活性増強には重要なのに対し、Ag 刺激では **4** は **2** ほど上昇しなかったので、Ag 刺激での活性には **2** の炭素骨格が重要であることが示唆された。

1) K. Kimura, *et al.*, *Fitoterapia.*, **83**, 907 (2012)
2) Abe, T., *et al.*, *Fitoterapia*, **113**, 188-194 (2016)

15,20-Dinor-5,7,9-labdatrien-18-al, 15,20-Dinor-5,7,9-labdatrien-18-oic acid, RBL-2H3 cells

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2A14a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A14 会場

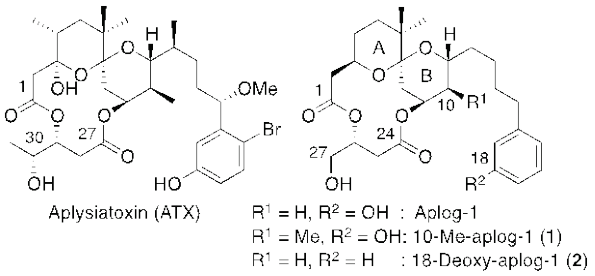
スピロ環をもたない aplysiatoxin 単純化アナログの合成, 配座, および活性

Synthesis, conformation, and biological activity of a des-A-ring analog of aplysiatoxin

○芦田 能基[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2]、入江 一浩[3] ([1]愛媛大院連合農、[2]香川大農、[3]京大院農)
○Yoshiki ASHIDA[1], Ryo C. YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyoto Univ.)

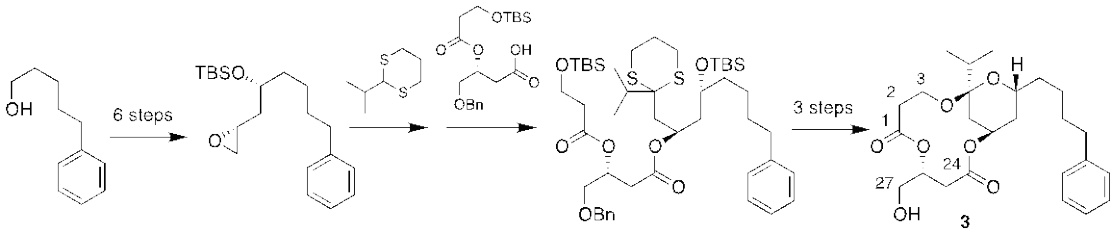
【背景・目的】

天然の発がんプロモーター・aplysiatoxin (ATX) の単純化アナログである 10-Me-aplog-1 (**1**) は, 特定のがん細胞株に対して顕著な増殖抑制活性を示す一方で, ATX のもつ強力な発がんプロモーション活性および炎症誘導作用を示さないことから, 新規抗がん剤シードとして注目されている (*J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614). しかしながら, **1** の合成には最長直線工程数 23 段階を要することから, より短段階で合成可能な高活性アナログの開発が求められている. Aplog類のスピロ環は, 受容体認識に必要なマクロジラクトン環のコンホメーションを活性型に制御していると考えられているが, このスピロ環構造の大幅な単純化はこれまでに達成されていない. 本研究は, 18-deoxy-aplog-1 (**2**) の A 環を除去し, 合成工程を **1** の半分以下に短縮したアナログ (**3**) の合成と, スピロ環が aplog 類のマクロジラクトン環の配座と活性に与える影響を明らかにすることを目的とした.



【方法・結果】

アナログ **3** は, 5-phenyl-1-pentanol から, マクロケタール化反応を鍵反応とする最長直線工程数 11 段階で合成した (総収率 8.5%). NMR およびコンピューターシミュレーションを用いた配座解析の結果, **3** の水素結合性官能基の空間的配置は aplog 類の配座を再現しているものの, C2 と C3 位が aplog 類とは異なる二面角をとっていることが示唆された. Aplog 類の細胞内標的である protein kinase C (PKC) の 7 種のアイソザイムに対する結合能を評価したところ, スピロ環をもたない **3** は, novel PKC (δ, ε, η, θ)に対して **2** の約 10 倍低い結合能を示した一方で, conventional PKC (α, β, γ) に対しては **2** と同程度の結合能を示した. この結果は, 異なるアイソザイム選択性をもつ ATX アナログを開発する上で, スピロ環部分の改変が有効であることを示唆している.



protein kinase C, tumor promoter, aplysiatoxin

発表責任者：柳田 亮（charlesy@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2A14a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A14 会場

担子菌類 *Coprinopsis cinerea* からの新規骨格を有する 2 種のノルセスキテルペノイド

Two novel skeletal norsesquiterpenoids from the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*

○大高 潤之介、二村 友史、長田 裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Junnosuke OTAKA, Yushi FUTAMURA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

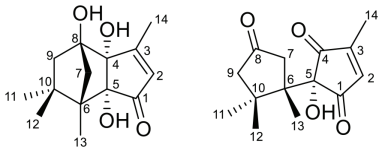
【目的】

ヒトヨタケ属(一夜茸、*Coprinopsis* sp.)に分類されるキノコは、子実体成熟後に傘部の酵素的融解を伴うのが特徴である。人口培養も容易であり、胞子 → 子実体形成までの期間が短いことからモデルキノコとして数多くの生物学的研究がなされてきた。2010 年には全ゲノムが解読され、本菌類に特徴的なセスキテルペノイド生合成関連酵素も同定されている。しかしその一方で、本属が産生する二次代謝物質に関する報告が極めて少ない。本研究では、ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* の産生する二次代謝物質およびそれらの生理活性を調査し、生合成や生態に関する新たな知見を得ることを目的とした。

【結果】

Coprinopsis cinerea の培養粗抽出物の化学成分調査において特異な UV スペクトルパターンを示す 2 種の新規化合物 hitoyol A (**1**) と hitoyol B (**2**) を既知化合物 lagopodin B とともに単離した。化合物 **1** と **2** の平面構造は NMR, MS, IR, UV スペクトル解析により明らかにした。両化合物ともに、炭素数 14 の新規骨格を有する norsesquiterpenoid であったため立体化学の解明を実施した。化合物 1 は NOE 差スペクトル、2D-NOESY 法からでは相対立体配置すら想定できなかったため、再結晶で得た単結晶の X 線結晶構造解析を試みた。その結果、**1** の絶対立体化学を *exo*-(4*S*,5*R*,6*S*,8*R*)-**1** と決定した。本結果は **1** の UV と ECD スペクトルの実測値と計算値の比較によっても裏付けられた。化合物 **2** の相対立体配置は NOE 差スペクトルにより明らかにした。さらに絶対立体配置は UV, ECD スペクトルの実測値と計算化学的手法を組み合わせることにより 5*S*,6*S* と決定した。

化合物 **1**, **2** は培養粗抽出物の主要構成成分 lagopodin B がベンジル酸転移→脱炭酸を経て生合成されると推測した。生理活性を調査した結果、化合物 **2** には弱い抗マラリア活性 (IC_{50} = 59 μM) が確認できた。[1]



1

2

[1] *Org Lett.* **2017** *19*,4030-4033. Junnosuke Otaka, Daisuke Hashizume, Yui Masumoto, Atsuya Muranaka, Masanobu Uchiyama, Hiroyuki Koshino, Yushi Futamura, and Hiroyuki Osada

Coprinopsis cinerea, terpenoid, Hitoyol

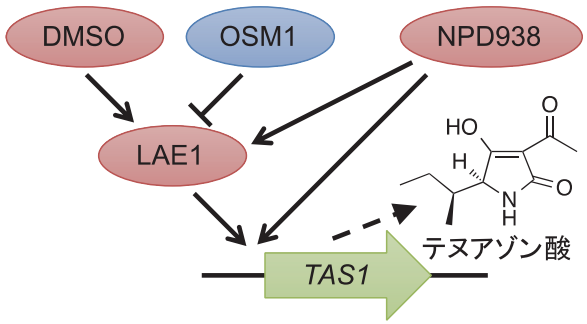
発表責任者：大高潤之介（junnosuke.otaka@riken.jp）

講演番号：2A14a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A14 会場

Pyricularia oryzae におけるテヌアゾン酸生産誘導化合物の探索と作用機構解析
Tenuazonic acid production-inducing compounds: Screening and mode of action analysis in *Pyricularia oryzae*
○本山 高幸、田中 陽子、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Takayuki MOTOYAMA, Yoko TANAKA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*（*Magnaporthe oryzae*）のゲノム中には約 50 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが、生産物が報告されているのはメラニンの遺伝子クラスターのみであった。我々は、二次代謝産物の生産誘導条件を見出すことにより、テヌアゾン酸（ポリケチド-非リボソームペプチド融合化合物）、ネクトリアピロン類（ポリケチド化合物）、及びピリクロール類（ポリケチド化合物）の生合成遺伝子クラスターを同定してきた。テヌアゾン酸はイネへの感染に関与する化合物で、その生産制御メカニズムの解明が必要とされる。現在までに、MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊及び DMSO 処理によりテヌアゾン酸の生産誘導が可能なことを見出し、生合成遺伝子 *TAS1* の同定に成功している。TAS1 は糸状菌から初めて報告された NRPS-PKS 融合酵素である。興味深いことに、TAS1 ホモログは様々な病原性糸状菌ゲノム中に存在する。また、二次代謝のグローバルレギュレーターLAE1 及び転写因子 TAS2 が生産に必要とされることを明らかにしている。今回、テヌアゾン酸生産誘導メカニズム解明のため、テヌアゾン酸生産誘導化合物の探索を行い、取得した化合物の作用機構解析を行った。
【方法と結果】イネいもち病菌を理研天然化合物バンク NPDepo の 376 化合物で処理し、テヌアゾン酸生産誘導を引き起こす化合物を探索した。イネいもち病菌の 2 種類の株に対して、2 種類の培地で静置培養し、全ての条件でテヌアゾン酸の生産誘導を引き起こす化合物 NPD866 をヒット化合物として得た。更に、NPD866 の類縁化合物 21 個を用いて構造活性相関を解析した結果、より強力な活性を示す NPD938 を見出した。興味深いことに、NPD938 はメラニンの生産を阻害する活性も示した。

NPD938の作用点を明らかにするため、OSM1及びLAE1の遺伝子破壊株をNPD938で処理し、テヌアゾン酸生産に対する影響をみた。その結果、NPD938は*Δosm1*株及び*Δlae1*株の両方に対してテヌアゾン酸生産誘導活性を示し、NPD938はOSM1及びLAE1と独立の経路で生産誘導していることが明らかになった。また、*Δlae1*株で生産誘導活性が低下することから、NPD938はLAE1経由での生産誘導も行っていることが示唆された。



本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

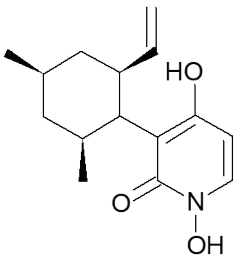
rice blast fungus Pyricularia oryzae, fungal secondary metabolism, NPDepo

講演番号：2A14a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A14 会場

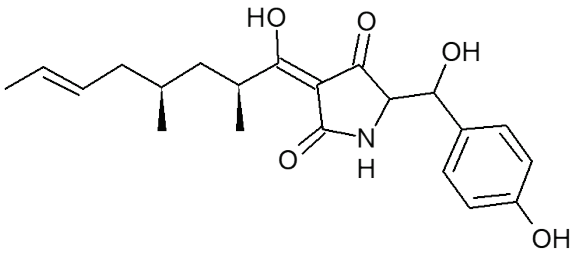
Tolypocladium album における NPD938 による二次代謝産物生合成遺伝子の発現誘導機構
Inducing mechanism of secondary metabolism caused by NPD938 in *Tolypocladium album*.

○石井 友彬[1,2]、本山 高幸[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東理大理工・応生)
○Tomoaki ISHII[1,2], Takayuki MOTOYAMA[1], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】今大会で本山らはテヌアゾン酸生産誘導活性を示す化合物として NPD938 を取得したことを報告した。この化合物は、テヌアゾン酸の生産を誘導するだけでなく、メラニンの生産を抑制する活性も示すことから、NPD938 は糸状菌の二次代謝制御に影響を及ぼしていることが示唆されている。本発表では、NPD938 がイネいもち病菌以外に対し二次代謝制御活性を示すかどうかを明らかにすること及び生産誘導される化合物の生合成遺伝子同定を目的として解析した結果について報告する。
【方法と結果】テルペンドール生産菌である糸状菌 *Tolypocladium album* に対して NPD938 を添加し、代謝産物の解析を行った結果、テルペンドール類と未知化合物の生産が誘導された。また、NPD938 を添加した菌体と DMSO を添加した菌体から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行うことで発現量を比較した。その結果、NPD938 によって 3 つの二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの鍵遺伝子の発現量（TPM）が変動していることが示唆された。クラスター番号 5 の鍵遺伝子 *g1834*（Ⅰ型 PKS)の発現量は約 17 倍に増加し、クラスター番号 31 の鍵遺伝子 *g7256*（NRPS-Ⅰ型 PKS)の発現量は約 23 倍に増加していた。これらの鍵遺伝子の近傍の遺伝子群の発現量も同様に増加していた。クラスター番号 35 の鍵遺伝子 *g8722*（Ⅰ型 PKS)の発現量は約 1/40 に抑制されていた。この鍵遺伝子の近傍の遺伝子群の発現量も同様に抑制されていた。この 3 つの鍵遺伝子を、2 回相同組み換えにより破壊し、代謝産物の解析を行った結果、*g7256* の破壊によって生産誘導される化合物のピークが消失することが確認できた。このピークの化合物は、ポリケチド-非リボソームペプチド融合化合物の pyridoxatin と F14329 であると推定された。今回の結果から *g7256* を含む遺伝子クラスターは pyridoxatin と F14329 を生産に関与していることが示唆された。



pyridoxatin



F14329

secondary metabolism, Tolypocladium album, pks-nrps

講演番号：2A14a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A14 会場

遊離脂肪酸による PI3K/Akt パスウェイ不活性化のメカニズム解析

Mechanism analysis of PI3K/Akt pathway inactivation by free fatty acids

○長澤 侑海、田代 悦、井本 正哉（慶應大理工）
○Yumi NAGASAWA, Etsu TASHIRO, Masaya IMOTO (Keio Univ.)

[背景・目的]

糖尿病は世界で 4 億 1500 万人が罹患しており、1 型と日本人罹患者の 90%を占める 2 型に分類される。2 型糖尿病の発症メカニズムの一つとして、インスリン応答による筋細胞での糖取り込みや肝臓での糖新生の抑制が十分でないため血糖値を下げられない、所謂インスリン感受性の低下がある。しかしインスリン感受性低下メカニズムは未だ不明な点が多く、根本的な糖尿病治療薬はないのが現状である。ところで近年、糖尿病患者では遊離脂肪酸の蓄積が観察され、またインスリンは PI3K/Akt パスウェイを活性化することで糖取り込みや糖新生を抑制するが、遊離脂肪酸がこのパスウェイを不活性化することが報告されている。よって、遊離脂肪酸による PI3K/Akt パスウェイ不活性化をキャンセルする化合物は、不明な点が多いインスリン感受性低下メカニズムの一端を明らかにするだけでなく、新たなインスリン感受性改善薬としても期待できる。そこで本研究では、その様な活性をもつ化合物の探索およびそのメカニズム解析を試みた。

[方法・結果]

ヒト肝がん HepG2 細胞にインスリンを添加すると 10 分後に Akt がリン酸化するが、飽和脂肪酸の一つパルミチン酸 200 μM を 8 時間前処理するとインスリンによる Akt リン酸化が抑制された。一方で、オレイン酸やリノール酸といった不飽和脂肪酸はインスリンによる Akt リン酸化を抑制できなかった。したがって、インスリンによる PI3K/Akt パスウェイの活性化は飽和脂肪酸選択的に不活性化された。そこでこの飽和脂肪酸による PI3K/Akt パスウェイ不活性化をキャンセルする化合物をリン酸化 Akt の発現回復を指標として、文科省・新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォームが配布している標準阻害剤キット SCADs から探索した。その結果、CDK2 を阻害することが報告されている CDK1/2 inhibitor Ⅲ、CDK2/9 inhibitor の 2 化合物に PI3K/Akt パスウェイ不活性化をキャンセルする活性があることを見出した。またこれら 2 化合物とは構造が異なるが CDK2 阻害活性を有する CDK2 inhibitor Ⅲも PI3K/Akt パスウェイ不活性化をキャンセルした。これらのことから飽和脂肪酸による PI3K/Akt パスウェイ不活性化に CDK2 の関与が示唆された。

insulin, PI3K/Akt pathway, CDK2

講演番号：2A14a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A14 会場

シスプラチンによる TGF-β シグナル活性化を介した EMT 誘導
Involvement of TGF-β signal activation in cisplatin-induced EMT
○田代 悦、今辻 沙也佳、井本 正哉（慶應大理工）
○Etsu TASHIRO, Sayaka IMATSUJI, Masaya IMOTO (Keio Univ.)

【背景と目的】
近年，転移能や制がん剤耐性を獲得した悪性がん細胞では上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition：EMT）が誘導されていると報告されているが，その EMT 誘導メカニズムについては不明な点が多い．そこで我々は，制がん剤シスプラチン（CDDP）を上皮由来の大腸がん LoVo 細胞に 3 ヶ月持続暴露することで，EMT を誘導した CDDP 耐性細胞（CDDP^{r}/LoVo）を樹立した．さらに，ケミカルゲノミクスの手法で CDDP^{r}/LoVo 細胞の EMT 誘導機構を解析した結果，CDDP^{r}/LoVo 細胞が EMT を維持するために TGF-βシグナルの活性化が必要であること，また CDDP^{r}/LoVo 細胞では親株の LoVo 細胞に比べて TGF-βの産生が亢進していることを見出した．すなわち，CDDP^{r}/LoVo 細胞では TGF-βの産生亢進による TGF-βシグナルの活性化によって EMT が誘導・維持されていることを報告してきた．そこで本発表では，親株の LoVo 細胞に CDDP を添加した時でも TGF-βシグナルの活性化を介した EMT 誘導が起こるのか検討した．
【方法と結果】
LoVo 細胞に CDDP を添加して培養液中の TGF-β量を測定した結果，24時間後には TGF-β量が増加していたことから，CDDP を添加すると短時間で EMT が誘導されると考えた．実際に CDDP 添加 3 日後には EMT 転写因子である Slug の発現上昇，それに引き続いて E-cadherin の発現減少と N-cadherin の発現上昇が見られ，EMT が誘導していた．そして CDDP による EMT 誘導は TGF-β受容体阻害剤で抑制されたことから，CDDP は TGF-βシグナルの活性化を介して EMT を誘導することがわかった．続いて LoVo 細胞以外の上皮がん細胞でも CDDP が EMT を誘導できるか検討した．その結果，肺がん A549 細胞に CDDP を添加するとやはり EMT が誘導し，それは TGF-β受容体阻害剤で抑制された．よって，A549 細胞でも CDDP は TGF-βシグナルの活性化を介して EMT を誘導していた．しかし一方で，遺伝子変異などによって TGF-βシグナルが不活性化している 6 種のがん細胞に CDDP を添加しても EMT は誘導されなかった．
【結論】
以上の結果より，CDDP をがん細胞に添加すると TGF-βシグナルの活性化を介して速やかに EMT を誘導，そして制がん剤耐性を獲得すると考えられる．

Cisplatin, EMT, TGF-β

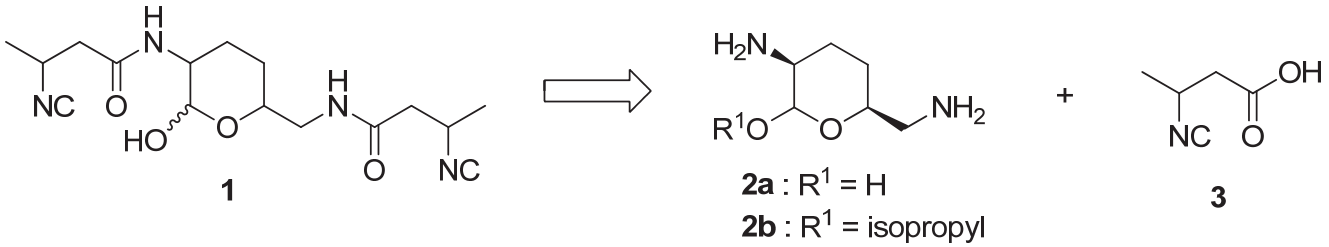
講演番号：2A14a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A14 会場

Candida albicans に菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A のケミカルバイオロジー研究
Chemical biology of RK-276A, an inducer of yeast to hyphal transition in *Candida albicans*

○山本 甲斐[1,2]、二村 友史[1]、清水 猛[1]、長田 裕之[1,2]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大学)
○Kai YAMAMOTO[1,2], Yushi FUTAMURA[1], Takeshi SHIMIZU[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Saitama Univ.)

【目的】真菌はヒトや農作物に感染し様々な病気や被害を引き起こす。既存薬には依然として安全性や選択性、菌の抵抗性といった問題があり、新薬の開発が強く求められている。我々は真菌の形態変化に着目した独自のスクリーニング系を構築し[1)]、微生物代謝産物から *Candida albicans* に対して菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A(**1**)を見出した。**1** は構造解析の結果、既知化合物 SF2768[2)]と同一平面構造を有する化合物であったが、絶対立体配置と作用機序については明らかになっていない。*Candida albicans* の酵母－菌糸の二形性の変化は病原性に深く関与していることから、本研究では作用機序解析および構造活性相関研究のため、**1** を有機化学的に合成することを目的とした。

【方法・結果】RK-276A(**1**)を合成するにあたり、アミノ糖 **2a** および側鎖 **3** をそれぞれ合成後、カップリング反応により合成することにした。糖部分に関しては文献[3)]を参考に 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl bromide を出発原料として合成中間体 **2b** を合成した。また側鎖 **3** の合成は *(R)*および *(S)*-3-aminobutyric acid を出発原料として行っている。**2b** の合成、**2b** から **2a** への脱保護およびカップリング反応について発表する。



1) Futamura Y; Yamamoto K; Osada H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2017) 81, 28-31.
2) 発正治、日本公開特許公報、特開平 06-234784、1994-08-23
3) Capaccio C. A. I; Varela O. *Tetrahedron: Asymmetry* (2000) 11, 4945-4954.

chemical biology, yeast to hyphal transition, RK-276A

講演番号：2A14a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A14 会場

糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 より単離した新規デカリン骨格含有二次代謝産物 wakodecaline C の構造

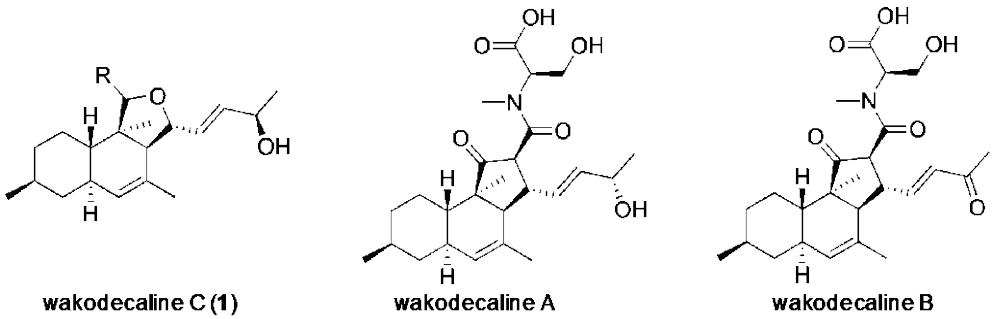
Wakodecaline C, a new decaline metabolite isolated from a fungus *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058

○野川 俊彦[1]、加藤 直樹[2]、清水 猛[1]、岡野 亜紀子[1]、二村 友史[1]、高橋 俊二[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研 CSRS・天然物生合成)
○Toshihiko NOGAWA[1], Naoki KATO[2], Takeshi SHIMIZU[1], Akiko OKANO[1], Yushi FUTAMURA[1], Shunji TAKAHASHI[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS)

【背景と目的】放線菌や糸状菌などの微生物は、多様な構造と特異な活性を有する二次代謝産物を生産することで知られている。そのような二次代謝産物を探索するために、我々はフラクションライブラリーとスペクトルデータベースを用いた構造指向型の化合物探索を行い、新規骨格を有する代謝産物の単離を行ってきた。その結果、糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 の培養抽出物よりデカリン骨格を有する新規二次代謝産物 wakodecaline A および B を単離・構造決定した（Nogawa *et al. J. Antibiot.* 2017）。この化合物は、デカリン骨格にシクロペンタノンが縮合した特徴的な三環式構造を有しており、生合成的にも興味深い構造であった。今回、同菌株よりさらに類縁体の探索を行い、新規化合物を見出したので報告する。

【実験】埼玉県和光市の土壌より分離した糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 の 4.8 L 培養液（0.5% yeast extract, 0.5% malt extract, 1% glucose, 1% soluble starch、28 ˚C、150 rpm、13 日間培養）を酢酸エチルで分配・抽出し、有機溶媒可溶性画分を得た。これを DAD-LC/MS 分析における UV およびマススペクトルを指標に各種クロマトグラフィーにより精製を進め、目的化合物 **1** を 5.7 mg 単離した。

【結果】高分解能質量分析より **1** の分子式を $C_{25}H_{35}NO_5$ と決定した。^{1}H および ^{13}C NMR スペクトルからはデカリン骨格を有する wakodecaline 類の類縁体であることが示唆された。詳細な構造は各種二次元 NMR スペクトルの解析より行った。**1** は、既存の wakodecaline 類と異なりデカリン骨格にテトラヒドロフランが縮合した三環式構造を有していた。相対立体配置は NOESY スペクトルより検討し、デカリン骨格において wakodecaline A および B と同様の立体を有することを確認した。以上より、**1** の構造を新規デカリン骨格含有二次代謝産物 wakodecaline C と決定した。各種生物活性評価の結果、**1** は HL60 細胞に対する細胞毒性および抗マラリア活性を有することを明らかにした。

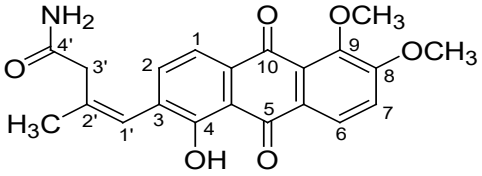


Natural product, Microbial metabolite, Isolation

講演番号：2A14a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A14 会場

新規アントラキノン kinanthraquinone の同定と生物活性評価
Identification and biological activity evaluation of kinanthraquinone.
○高木 海[1]、野川 俊彦[2]、二村 友史[2]、長田 裕之[2]、高橋 俊二[1] ([1]理研 CSRS・天然物生合成ユニット、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○ Hiroshi TAKAGI[1], Toshihiko NOGAWA[2], Yusi FUTAMURA[2], Hiroyuki OSADA[2], Shunji TAKAHASHI[1] ([1]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】微生物は様々な構造や生理活性を有する二次代謝産物を生産する。それらの中には医薬品や農薬、生命現象を解き明かすバイオプローブとして利用されている化合物が存在している。近年、新規天然化合物の取得が困難となり、効率的な探索が重要である。我々は、微生物代謝産物を系統的に分画し、各フラクションの LC/MS 分析結果を基に、天然化合物データベース(NPPlot) を構築している。本研究では、NPPlot を活用して放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* SN-593 から新規化合物を取得し、生物活性評価を行うことを目的とした。
【方法及び結果】*S. reveromyceticus* SN-593 の培養抽出液の LC/MS 分析の結果より、420 nm 付近に UV 吸収を示し、ネガティブモードで *m/z* 380 の擬分子イオンを示す新規性の高い化合物が見出された。本化合物は生産量が少ないために様々な培養条件の検討を行ったところ、reveromycin 生産培地（RM-PM）から硫酸銅を除いた培地で培養した場合に生産性が向上した。そこで、同条件で培養スケールを上げて 5 日間培養 (4.9 L) を行った。その後、酢酸エチル抽出により得られた抽出物 (2.4 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、次いでアセトニトリル－0.05% ギ酸水系の逆相 HPLC を用いて精製し、目的の化合物を回収した。その後、溶媒を除去乾燥することによって橙色の針状結晶 2.9 mg が得られた。得られた化合物は高分解能マススペクトルから分子量 *m/z* 380.1111 $[M-H]^-$、分子式 $C_{21}H_{19}NO_6$ を決定し、分子内に窒素原子を有することが明らかになった。また、各種 NMR スペクトルの解析から、本化合物は末端部分にアミド側鎖を有する新規アントラキノン化合物 kinanthraquinone であることが明らかになった。類似構造を有するアントラキノンについての特許報告に、3 例の構造が記載されており、1 位の水酸基、8, 9 位のメトキシ基、2’位の水酸基の有無で構造が異なっていた[1)]。本化合物を各種アッセイ系で評価したところ HL-60 細胞及び *src*^{ts}-NRK 細胞に対しそれぞれ弱い細胞毒性（IC_{50} = 7.9, 10 μM）を示した。



kinanthraquinone

1) Changsheng, W. U., Phillippus, G *et al*., *PCT Int. Appl.* WO 2016195495 A2 (2016).

Streptomyces, anthraquinone

講演番号：2A14a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A14 会場

去勢抵抗性前立腺がん選択的な細胞死誘導物質の活性評価

YM155, a inhibitor of survivin, induces selective apoptosis in castration resistant prostate cancer cell

○濱村 祐輝[1]、小坂 威雄[2]、田代 悦[1]、大家 基嗣[2]、井本 正哉[1]([1]慶大理工、[2]慶大医)
○Yuki HAMAMURA[1], Takeo KOSAKA[2], Etsu TASHIRO[1], Mototsugu OYA[2], Masaya IMOTO[1]([1]Department of biosciences and informatics, Faculty of science and technology, Keio University, [2]Department of Urology, Faculty of medicine, Keio University)

【目的・背景】前立腺がんは精巣や副腎より分泌された男性ホルモンに依存して増殖することから,現在,前立腺がんに対しては外科的な精巣摘除や内分泌療法によりホルモンの供給を断つホルモン療法が有効とされている．しかし，がんは次第にこれらのホルモン療法に対し抵抗性を獲得し,さらに悪性化した去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)と呼ばれる病態へ移行する.このCRPCに対して未だ有効な治療法が見つかっていないため,CRPC の去勢抵抗性獲得メカニズムの解明が急務とされている.そこで本研究では,CRPC に対して選択的に細胞死を誘導する化合物の探索を行い,見出された化合物の作用機序を解析することで CRPC の去勢抵抗性獲得メカニズムの解明及び新規治療薬シード化合物の取得を目的とした.
【方法・結果】慶應大・医学部の大家・小坂により樹立された 2 つの CRPC モデル細胞系列（LNKO と C4-2）の中からアンドロゲン不含培地で 0，12 と 24 か月持続培養した細胞株を選択し，これら 6 種の細胞に文科省・新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォームが配布する標準阻害剤キット（SCADS）の 400 化合物を添加，72 時間後の細胞増殖阻害活性を ATP アッセイにて評価した．その結果､親株のLNCaP細胞に比べCRPC細胞に対してより増殖抑制を誘導する化合物を16種類見出した.さらにこれら16種類についてLNCaP細胞とCRPC細胞に対する細胞死誘導活性を測定した.その結果,アポトーシス抑制タンパク質 survivin の阻害剤である YM155 が,CRPC 細胞に対しては survivin の発現を減少させる濃度で細胞死を誘導したが,同濃度の YM155 は LNCaP 細胞に対しては survivin の発現を減少させずまた細胞死も誘導しないことが見出された.
(1) Michael N. *et al. Mol Cancer Res*, 2017

chemical biology, prostate cancer

講演番号：2A14a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A14 会場

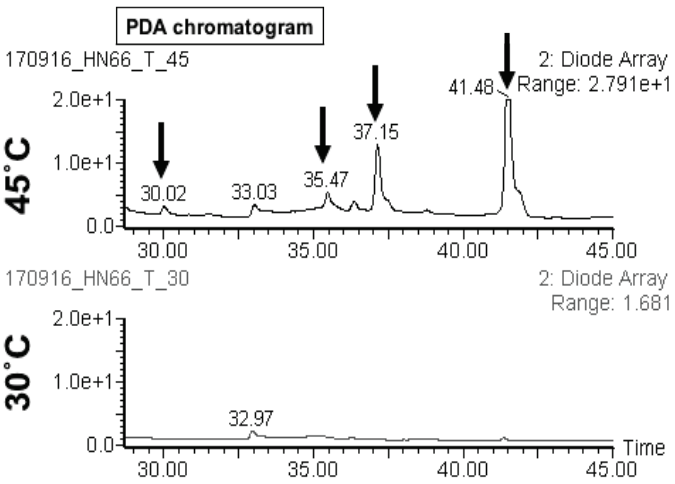
耐熱性放線菌が生産する熱ショック代謝物(HSM)の研究

Heat shock metabolites (HSM) produced by thermotolerant streptomyces

○加藤 航、齋藤 駿、田代 悦、井本 正哉（慶大院・理工）
○Wataru Kato, Syun Saito, Etsu Tashiro, Masaya Imoto (Keio Univ.)

【背景・目的】放線菌はこれまで、多様な構造・生理活性を有する二次代謝産物を多数生産し、これらの代謝物は疾患の治療薬、農薬、動物薬など多岐にわたって用いられている。このことから、放線菌は極めて魅力的な微生物資源であると言える。しかし近年、微生物からの新規化合物取得率は低下しており問題となっている。その原因の１つとして考えられているのが休眠遺伝子である。一株の放線菌には約 30 個もの二次代謝産物生合成遺伝子群が存在しているが、その多くは休眠状態にあると考えられている。そのため、これらの生合成遺伝子群を効率的に活性化する手法の開発が求められている。そこで我々が注目したのが”耐熱性放線菌”である。我々は、放線菌を常温(30˚C)よりも 10-15 度高い温度で培養することで転写促進などが起こり、休眠遺伝子の活性化が誘発されると考えた。本研究では耐熱性放線菌が高温培養選択的に生産する代謝物を Heat Shock Metabolites(HSM)と名付け、それらの解析を行った。

【方法・結果】耐熱性放線菌の探索を行った結果、寒天培地上において通常の 30˚C 培養で生育する 3040 種の放線菌のうち、46 種が高温(45˚C)で生育することを確認した。耐熱性放線菌を高温(45˚C)と通常の 30˚C で培養後、代謝物生産を LCMS を用い比較したところ、複数の HSM が生産されたことを確認した（右図)。また、30˚C 培養と 45˚C 培養では放線菌の増殖に差異が見られ、多くの放線菌において高温培養では培養後 5 日目の菌体量が 30˚C に比べ減少していることが明らかとなった。続いて、耐熱性放線菌を培養するにあたり、抽出方法・精算培地・培養温度などの条件検討を行った。これらの条件検討により培養方法を確立し、得られた各培養液の n-BuOH 抽出物の解析を行った。HSM の比較検出には①LCMS 分析、②各種の生理活性アッセイの 2 つの手法を用いた。ここでは 45˚C 培養において 30˚C 培養よりも増殖速度が速い放線菌群に着目した。その結果、LCMS 分析により複数の HSM の存在が明らかとなり、また生理活性を持つ HSM の存在も明らかとなった。現在は上記で示した各 HSM の解析を進めている。



Heat Shock Metabolites, Thermotolerant streptomyces, Chemical Biology

講演番号：2A15a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A15 会場

破骨細胞分化に対するブラジル産グリーンプロポリス由来化合物の作用

Effects of compounds isolated from Brazilian green propolis on osteoclastogenesis.

○出口 有佑[1]、川上 俊成[1]、小川 ゆり[2]、遠藤 ゆき[2]、渡辺 章夫[3]、バストス ジャイロ ケヌップ[4]、米澤 貴之[3]、禹 済泰[2] ([1]中部大応生院、[2]中部大応生、[3]中部大生機研、[4]サンパウロ大)
○Yusuke DEGUCHI[1], Tosinari KAWAKAMI[1], Yuri OGAWA[2], Yuki ENDO[2], Akio WATANABE[3], Jairo kenupp BASTOS[4], Takayuki YONEZAWA[3], Je-Tae WOO[2] ([1]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ., [3]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [4]Univ. of Sao Paulo)

【背景・目的】高齢化社会の日本において骨粗鬆症は大きな課題となっている。骨粗鬆症の原因としては加齢や閉経があるが、そのメカニズムは骨吸収を担う破骨細胞の作用が骨形成を担う骨芽細胞の作用を上回り骨吸収が促進され、骨密度の低下を引き起こすことである。そのため、骨形成を促進する化合物や骨吸収を抑制する化合物の探索が行われている。プロポリスの成分である caffeic acid phenethyl ester については破骨細胞分化抑制作用の報告が既にあるが、本研究では、ブラジル産グリーンプロポリスに多く含まれている桂皮酸誘導体で、骨代謝に対する報告がない artepillin C、baccharin、drupanin に着目し、破骨細胞の分化に対する作用を評価した。
【方法】マウス由来のマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞は破骨細胞への分化誘導因子である RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) を処理することで多核の破骨細胞に分化することが知られている。培養プレートに RAW264 細胞を播種後、6 時間後に RANKL および、サンプルを添加し 4 日間培養した。4 日間培養後、細胞を固定し、破骨細胞特異的酵素である TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) 活性の測定および TRAP 染色を行い、破骨細胞の分化へのサンプルの作用を評価した。また、RAW264 細胞を培養プレートに播種後、RANKL およびサンプルを添加し、1 日間および 3 日間培養後、Total RNA を抽出し、qRT-PCR により破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を評価した。
【結果・考察】artepillin C、baccharin、drupanin は、RAW264 細胞において RANKL 刺激により誘導される TRAP 活性を抑制した。また、破骨細胞分化マーカー遺伝子である *Trap*、*Ctsk* の mRNA 発現を減少させた。
ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる artepillin C、baccharin、drupanin は、破骨細胞への分化を抑制したことから、骨吸収抑制効果が期待され、骨粗鬆症の予防に役立つ化合物である可能性が示唆された。今後、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスでの骨代謝への作用を評価し応用可能性を検証していく予定である。

Osteoclast, Brazilian green propolis

講演番号：2A15a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A15 会場

Stylissatin A の抗炎症及び抗肥満活性に関する研究

Anti-inflammation and adipogenesis inhibition functions of stylissatin A

○張 夢華[1]、砂場 大輝[2]、木越 英夫[2]、北 将樹[3] ([1]筑波大グローバル教育院、[2]筑波大院数理物質、[3]名大院生命農)
○Menghua ZHANG[1], Taiki SUNABA[2], Hideo KIGOSHI[2], Masaki KITA[3] ([1]HBP, Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Nagoya Univ.)

生理活性ペプチドは構造や機能に多様性が見られるが、特に環状ペプチドは有機小分子と生体高分子のギャップを補完する「中分子創薬」の候補として近年注目されている。環状ペプチドは鎖状化合物に比べてコンフォメーションが制限されるため、特定の標的分子に対してより強く相互作用し、強力な薬理活性を発現する場合が多い。

Stylissatin A はパプアニューギニア産の海綿 *Stylissa massa* から単離された 4 種類の L-アミノ酸からなる環状ヘプタペプチドである。本化合物はリポ多糖で刺激したマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞に対して、炎症反応のメディエーターの一つである一酸化窒素の生産を抑制することから（EC_{50} = 87 μM）、抗炎症剤のリード化合物として期待される。我々は、本化合物の作用機序の解明を目指して、stylissatin A の全合成及び構造活性相関研究により、天然物の約 6 倍強い NO 産生抑制活性を示す誘導体を創製した。さらに本化合物のビオチン誘導体を用いて RAW264.7 細胞の抽出液から長鎖アシル CoA 脱水素酵素（ACADL, acyl-CoA dehydrogenase, long chain）を標的タンパク質として同定した。

また、stylissatin A の誘導体がマウス線維芽細胞（3T3-L1）の脂肪細胞への分化と脂肪滴の蓄積を顕著に阻害し、その活性の強さは上記の抗炎症活性に概ね相関が一致した。3T3-L1 細胞における stylissatin A の標的分子はこれまでにわかってないが、本化合物の作用機序解明により、炎症と脂肪細胞分化に共通する新たなシグナル伝達系の理解に繋がると期待される。本発表では今までの研究成果の詳細について報告する。

cyclic peptide, anti-inflammation, adipogenesis inhibition

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A15a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A15 会場

3,5-ジガロイル化フラバン-3-オール誘導体をリード化合物とした構造-活性相関研究
Structure-activity relationship study of 3,5-di-O-galloyl-flavan-3-ol derivatives

村上 誠[1]、○道下 僚[2]、小川 明日華[2]、西野 祐樹[2]、辻 一成[2]、花岡 裕也[2]、法島 太一[1]、西村 拓哉[1]、東野 雄祐[1]、濱田 義知[1]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工・先端、[2]大阪電通大・工・環境)
Makoto MURAKAMI[1], ○Ryo DOGE[2], Asuka OGAWA[2], Yuki NISHINO[2], Issei TSUJI[2], Yuya HANAOKA[2], Taichi HOJIMA[1], Takuya NISHIMURA[1], Yusuke HIGASHINO[1], Yoshitomo HAMADA[1], Akiko SAITO[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU)

【目的】

フラバン-3-オール誘導体は様々な食品に含まれており、食経験が豊富な高機能性物質として注目されている。一方で、これらは比較的単純な構造を持つ化合物にもかかわらず、その微細な立体構造の違いや修飾の有無、その修飾位置や導入される官能基の種類によって大きくその生物活性が異なる。さらに、植物中に極めて構造の近い類縁体が複数同時に含まれ、それぞれの化合物を純粋に単離・構造決定することが極めて困難なため、構造-活性相関の詳細を解明するのが困難である。我々は、このようなフラバン-3-オール誘導体の立体や化学的修飾が生物活性にどのように影響するのか、また、どのような構造がより高い活性を示すのかを明らかにするため研究を行っている。

我々はこれまでに、それぞれ(+)-catechin と(−)-epicatechin から誘導したジガロイル誘導体 **1**、**4** を合成し、HeLa S3 に対する細胞増殖抑制活性試験を行ったところ、**1** はほとんど活性を示さなかったのに対して **4** は高い活性を示した。一カ所の立体のみで大きく活性が異なることは非常に興味深く、フラバン-3-オール骨格を持つ化合物のさらなる活性向上が期待できる結果だと考えている。

本発表では、活性が低かった化合物 **1**、また、活性が高かった **4** をリード化合物とした合成研究を行い、構造-活性相関研究を行ったので報告する。

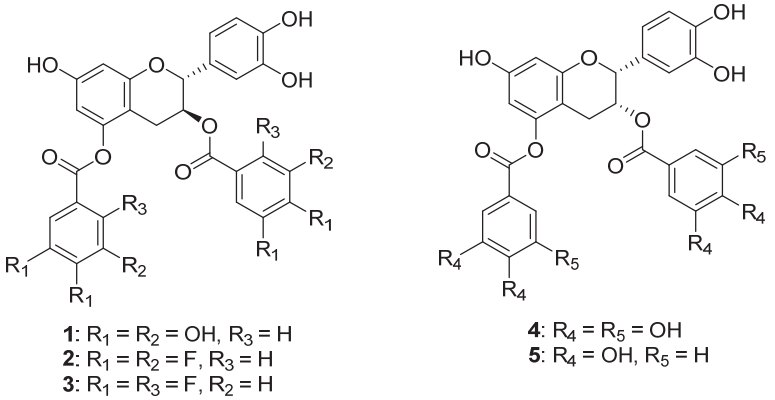


Figure 1. 3,5 位を修飾したフラバン-3-オール誘導体の構造

【方法・結果】

化合物 **1** の２つのガロイル基の水酸基をフッ素に置換した化合物 **2**、および、フッ素の導入位置が異なる化合物 **3** を合成し、HeLa S3 細胞に対する細胞増殖抑制活性試験を行ったところ、化合物 **4** よりも高い活性を示した。また、さらに、活性が高かった化合物 **4** の、ガロイル基を水酸基が２つのプロトカテク基に置換した結果、若干の活性低下があったことから、**4** の活性発揮には Fig. 1 中 R_5 の水酸基が必要であることが明らかになった。

Flavan-3-ol derivatives, Inhibitory activity against HeLa S3 cell proliferation, Structure-activity relationship

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2A15a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A15 会場

アミロイドβ42 の毒性オリゴマーの細胞内標的探索

Search for target proteins of intracellular toxic oligomers of amyloid ß42

○片岡 翔太郎[1]、村上 一馬[1]、徳田 真樹[1]、泉 俊輔[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]広大院理)
○Shotaro KATAOKA[1], Kazuma MURAKAMI[1], Maki TOKUDA[1], Shunsuke IZUMI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】アルツハイマー病の原因物質である 42 残基のアミロイドβタンパク質（Aβ42）は，凝集（オリゴマー化）することによって神経細胞毒性を示す．本研究グループは，Aβ42 の 22, 23 番目のアミノ酸残基付近でのターン構造を特徴とした「毒性コンホマー」の存在を明らかにし，本コンホマーはオリゴマー化しやすいことを報告している．最近，毒性コンホマーからなる Aβ42 の毒性オリゴマーは細胞内に蓄積しやすいことが明らかになりつつある．これまでに報告されている Aβの標的分子は細胞膜上に存在するものが多いが，細胞内における標的分子およびその作用機構については不明な点が多い．そこで本研究では，Aβ42 の毒性オリゴマーを模倣した 2 量体モデルを用いて，ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) の細胞質抽出液から標的タンパク質の探索を行った．また，得られた標的候補について，RNA 干渉法を用いて発現量をノックダウンすることにより，Aβ42 の神経細胞毒性への寄与を調べた．

【方法・結果・考察】毒性コンホマーを形成しやすい E22P-Aβ42 について，オリゴマー形成に重要な C 末端コア内 (Val40) で，L,L-2,6-diaminopimelic acid (DAP) で架橋した二量体モデル（下図）は，SH-SY5Y 細胞に対して強い神経細胞毒性を示す[1)]．このダイマーモデルの N 末端をビオチン標識することにより，毒性オリゴマーの構成単位を模したプローブとした．本プローブを 24 時間インキュベーションしてオリゴマー化（6 量体以上）させたものを，SH-SY5Y 細胞の細胞質抽出液と反応させた後，ストレプトアビジン修飾した磁性ビーズで結合タンパク質を回収した．結合タンパク質を電気泳動で分離し，毒性オリゴマーに特異的なバンドを MS/MS 解析したところ，5 種の標的候補タンパク質を得た．次に，SH-SY5Y 細胞を siRNA 処理によってそれぞれをノックダウンした後，MTT 試験を行った．その結果，RNA 結合タンパク質の HuC/D をノックダウンした場合にのみ，Aβ42 による細胞毒性が顕著に緩和された．一般に，HuC/D は神経系において mRNA の AU リッチ配列に結合し，タンパク質への翻訳機構を調節している．得られた結果は，HuC/D が Aβ42 の毒性オリゴマーと直接結合することによって，毒性発現に影響を与えるという新しい知見を示している．

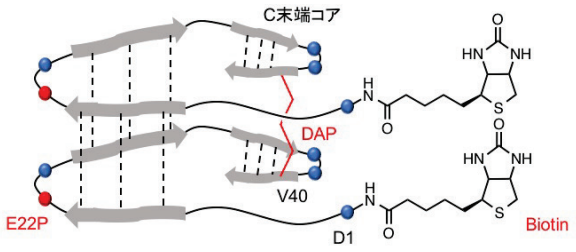


図　Aβ42 の毒性ダイマープローブ

1) Murakami, K. *et al., Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29038

amyloid ß, oligomer, siRNA

講演番号：2A15a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A15 会場

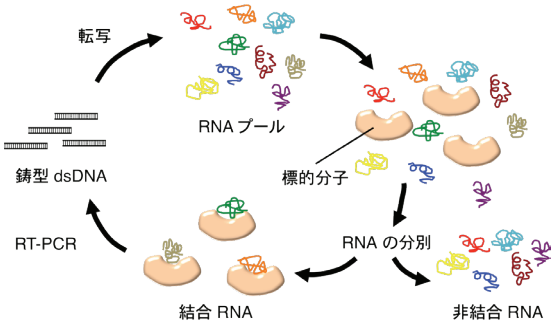
アミロイドβ42 の毒性 2 量体モデルから形成されるプロトフィブリルを標的とした RNA アプタマーの開発

Selection of RNA aptamers against protofibrils originated from the toxic dimer model of amyloid ß42

○小畑 弥生、村上 一馬、関川 あさ、入江 一浩（京都大農）
○Yayoi OBATA, Kazuma MURAKAMI, Asa SEKIKAWA, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

【研究背景】アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β42（Aβ42）の凝集経路には、線維化に至る過程と、球状構造体やプロトフィブリル（PF）などのオリゴマーを形成する過程が存在する。近年、Aβ42 の毒性本体は、線維ではなくオリゴマーであるとする「オリゴマー仮説」が広く受け入れられている。本研究グループは、毒性コンホマーを形成しやすい E22P-Aβ42 の 40 番目を L,L-2,6-diaminopimelic acid で架橋した 2 量体を合成し、これが準安定なオリゴマーを形成するとともに神経細胞毒性を示したことから、毒性オリゴマーモデルの一つとして報告した（Murakami, K. *et al*., *Sci. Rep*. **2016**, *6*, 29038）。同時に、毒性オリゴマー特異的なモノクローナル抗体を開発し、早期のアルツハイマー病の診断への応用研究を進めている。一方、一本鎖核酸からなるアプタマーは、様々な高次構造を取ることによって、抗体と同様に標的化合物に対して高い選択性と結合能を示す。アプタマーは、抗体よりも合成コストを大幅に抑えられることから、本研究では、Aβ42 の毒性オリゴマーに特異的に結合する RNA アプタマーの開発を目的とした。

【方法と結果】RNA アプタマーの選抜には試験管内人工進化法（SELEX：下図）を用いた。まず E22P-Aβ42 の 2 量体ならびにオリゴマー（6 量体以上）を標的として、ビーズ法により選抜を試みたが、いずれの場合も RNA プールを十分に濃縮することができなかった。そこで、オリゴマーの中でも高分子量かつ安定な構造体である PF に対して、メンブレンフィルター法（50 kDa 以下を排除）で選抜を行ったところ、PF に結合した RNA プールを濃縮することができた。Round 7 終了後、クローニング及びシークエンス解析を行った結果、34 個のクローンを得た。続いて、これらのクローンの PF 結合能を評価したところ、特に優れた結合能を有する 3 種のモノクローンをアプタマー候補として得た。CD スペクトルによる二次構造解析の結果、3 種のモノクローンはいずれも G-quadruplex 構造を形成しており、その形成頻度は選抜前の鋳型ライブラリーに比べて増大していた。以上より、得られたモノクローンによる PF 結合に G-quadruplex 構造の形成が関わっている可能性が示唆された。得られたアプタマー候補による PF の神経細胞毒性の抑制試験の結果についても報告する予定である。



図：SELEX の概略

amyloid ß, aptamer, oligomer

講演番号：2A15a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A15 会場

青枯病の化学防除を志向したクオラムクエンチング剤の開発
Development of chemical inhibitors of *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*
○吉原 彩華、嶋谷 美香、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Ayaka YOSHIHARA, Mika SHIMATANI, Kenji KAI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は 200 以上の植物種に感染するグラム陰性細菌であり，維管束内で大量の細胞外多糖（EPS）を産生することで植物を萎凋・枯死させる。病原力因子である EPS，バイオフィルムおよび ralfuranone 類などの産生は *phc* クオラムセンシング（QS）に制御されており，そのシグナル分子は (*R*)-methyl 3-hydroxymyristate（3-OH MAME）である。メチル基転移酵素 PhcB により合成された 3-OH MAME は，6 回膜貫通タンパク質 PhcS に受容されると考えられている。PhcS はレスポンスレギュレーターPhcR をリン酸化し，グローバルビルレンスレギュレーターPhcA を活性化することで，病原力因子の発現を誘導する。QS クエンチング（QQ）剤は菌を殺すことなく，病原性のみを抑制するため，薬剤耐性菌を出現させにくい理想的な農薬のリード化合物として期待される。そこで今回，3-OH MAME の構造アナログをデザイン・化学合成し，その中から特に有望と思われる QQ 剤 4 種を見出した。それらの QQ 活性を調べるとともに，植物体における青枯病防除効果を検証したので報告する。
【方法・結果】はじめに，3-OH MAME アナログ 10 種を合成し，バイオフィルム形成阻害アッセイを用いて，終濃度 100 μM における QQ 活性を調べたところ，methyl 3-hydroxy-8-phenyloctanoate（PQI-1）が阻害活性を示した。続いて，PQI-1 の部分構造を改変したアナログ 25 種を合成し，終濃度 10 μM でそれらの QQ 活性を評価した。その結果，4 種の強力な QQ 剤 PQI-2―5 を見出した。これらの化合物は，バイオフィルム形成，ralfuranone 産生，ralfuranone 生合成遺伝子 *ralA* の発現および EPS I 産生を数μM オーダーで完全に抑制した。さらに，青枯病防除において PQI 類処理が有効かどうか検証した。本菌を接種したトマト植物体を PQI 類含有水耕液で 10 日間培養したところ，PQI 類の濃度依存的にトマト植物体の萎凋症状が抑制された。一方，無処理区のトマト植物体は 7 日目には完全に枯死した。*in vitro* で最も高い QQ 活性を示した PQI-5 は，処理期間を接種後 10 日間から 3 日間に短縮した場合でも，青枯病の発病を完全に抑制した。これらの結果は，QQ が農作物を青枯病から防除する有効な手法であることを強く示唆した。
PQI 類の立体配置が QQ 活性に与える影響について調べるため，バイオフィルム産生阻害アッセイを用いて，光学分割した PQI 類の QQ 活性を評価した。その結果，PQI-2 と-4 では *R* 体，PQI-3 と-5 では *S* 体にそれぞれ強い活性が認められた。現在，ralfuranone 産生，*ralA* の発現および EPS I 産生に対する阻害活性を調べ，光学異性体の詳細な QQ 活性を評価している。

Ralstonia solanacearum, quorum sensing, quorum quenching

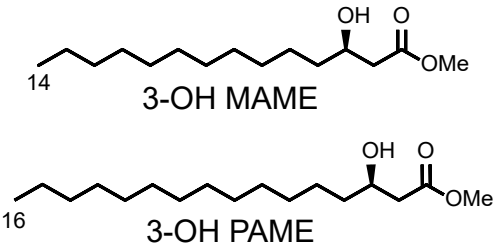
発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A15a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A15 会場

青枯病菌の 3-OH PAME 型クオラムセンシング機構を阻害するアンタゴニストの創製
Development of potent inhibitors of *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*

○坂田 恵、吉原 彩華、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Megumi SAKATA, Ayaka YOSHIHARA, Kenji KAI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は，200 以上の植物種に感染するグラム陰性細菌である。本菌は根の傷などから宿主植物に侵入すると維管束で爆発的に増殖し，大量の細胞外多糖（EPS）を生産する。EPS により維管束での通水が阻害され，植物は萎凋症状を呈する。青枯病菌の病原力因子は EPS の他にバイオフィルム，二次代謝物，細胞壁分解酵素などがあり，これらの病原力因子の産生はクオラムセンシング（QS）によって調節されている。この QS 機構を制御するシグナル分子は，炭素鎖長 14 の(*R*)-methyl 3-hydroxymristate（3-OH MAME）と炭素鎖長 16 の(*R*)-methyl 3-hydroxypalmitate（3-OH PAME）であり，青枯病菌の菌株はいずれか一方のみを QS シグナル分子として利用している。我々は現在，3-OH MAME 型 QS 機構を阻害するアンタゴニストの研究を行っており，PQI 類が強い QS 阻害活性を示すことを報告している。しかし，PQI 類は 3-OH PAME 型の QS 機構を十分には阻害できなかった。そこで本研究では，PQI 類をベースとして新しい化合物を合成し，3-OH PAME 型 QS 機構を強く阻害するアンタゴニストを得ることを目標とした。



【方法と結果】PQI 類は，C14 型 QS 機構を阻害するアンタゴニストである。C16 型 QS 機構を阻害する化合物を作るには炭素鎖長を伸ばすことが有効と考え, PQI 類の炭素鎖長を 1～3 つ伸ばした化合物を化学合成した。3-OH PAME 型 QS 機構を持つ K60 株を用いて，各化合物のバイオフィルム形成阻害作用を指標に, QS 機構の阻害活性を評価した。終濃度 100 μM になるように化合物を添加した CPG 培地 96 μl と CPG 培地で OD_{600}=0.1 に調節した K60 株細胞液 5 μl を 96 穴プレートに分注し, easy breath membrane を貼り，30℃で 20 時間静置培養した。1% w/v クリスタルバイオレット 25 μl を加え，室温で 25 分静置した後，余分なクリスタルバイオレットを除去し，水 200 μl で 2 回洗浄した。エタノール 200 μl を加え，10 分間静置し，抽出したクリスタルバイオレットについて 595 nm で吸光度を測定した。その結果, PQI に炭素鎖を 1 つ伸ばした化合物が最も強いバイオフィルム形成阻害活性を示し，炭素鎖が長くなるほど阻害活性が弱くなった。なお，添加したすべての化合物が生育阻害活性を示さなかった。これらの化合物が他の病原力因子産生も阻害するのかどうか現在検討しており、それらの結果も報告する予定である。

Ralstonia solanacearum, quorum sensing, quorum quenching

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A15a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A15 会場

アプリシアトキシン単純化アナログ・10-Methyl-Aplog-1 の側鎖誘導体の合成と活性

Synthesis and Biological Activities of the Side Chain Derivatives of 10-Me-Aplog-1, a Simplified Analog of Aplysiatoxin

○高田 晃児[1]、花木 祐輔[1]、菊森 将之[1]、徳田 春邦[1]、柳田 亮[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]香川大農)

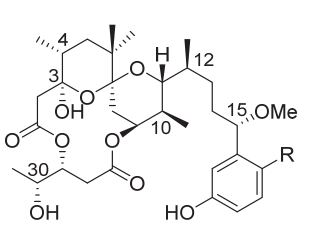
○Koji TAKADA[1], Yusuke HANAKI[1], Masayuki KIKUMORI[1], Harukuni TOKUDA[1], Ryo C. YANAGITA[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ.)

【背景・目的】

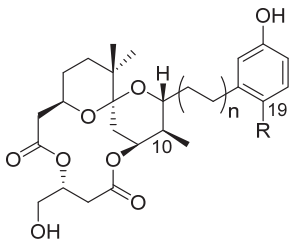
Protein Kinase C (PKC) は，遺伝子発現，細胞増殖，分化，アポトーシス等に関わるため，がん治療における標的酵素として注目されている．Aplysiatoxin (ATX) は，PKC の C1 ドメインに結合することにより PKC 全体の疎水性を上げ，膜移行させて活性化する．ATX の脱ブロモ体である Debromoaplysiatoxin は特定のがん細胞の増殖を顕著に抑制するが，副作用として炎症作用，発がん促進作用を示すため，それ自身を治療薬として用いることはできない．当研究室では ATX の構造を論理的に単純化することにより，PKC 活性化能を保持した上で，副作用を取り除いた抗がん剤シーズである 10-Me-Aplog-1 の開発に成功している (Kikumori, M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614)．最近, 10-Me-Aplog-1 の側鎖のフェノール性水酸基を除き, かつ芳香環を還元することによって, PKCδ の C1B ドメインとの結合能が弱くなり，一方で副作用が認められたことから，側鎖の重要性が指摘されている (Hanaki, Y. *et al.*, *Molecules* **2017**, *22*, 631)．本研究では，側鎖の更なる役割を明らかにすることを目的として，10-Me-Aplog-1 の側鎖長を改変して各種生物活性を調べた．

【方法・結果】

10-Me-Aplog-1 の側鎖を 2 つ減炭した **1** を，*m*-hydroxycinnamic acid から 19 段階で合成した．同時に ATX の側鎖と同じ位置に臭素原子を導入することにより，疎水性を 10-Me-Aplog-1 と同程度に調整した **2** を，**1** より誘導した．発がんの抑制に関わる PKCδ の C1B ドメインに対する結合試験の結果，10-Me-Aplog-1 と比べて **1** は約 8 倍弱く，**2** は同程度の結合能を示した．これより，結合においては側鎖の長さよりも疎水性の寄与が高いことが示唆された．しかしながら，マウス耳介を用いた炎症試験により，170 nmol 塗布で **1** は 10-Me-Aplog-1 と同様にほとんど炎症を惹起しなかったのに対して，**2** は有意な炎症作用を示した．PKCδ の C1B ドメインに対する結合能が同程度である 10-Me-Aplog-1 と **2** の炎症作用に有意な差があることは，今後 10-Me-Aplog-1 をリードとした抗がん剤シーズを設計する上で，側鎖の長さも考慮することが重要であることを示唆している．



R = Br : Aplysiatoxin
R = H : Debromoaplysiatoxin



n = 2, R = H : 10-Me-Aplog-1
n = 1, R = H : **1**
n = 1, R = Br : **2**

Protein Kinase C, Aplysiatoxin, Anti-proliferative

発表責任者：入江　一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A15a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A15 会場

抗腫瘍性 Aplysiatoxin 誘導体・10-Me-Aplog-1 のアセタール型アナログの合成と生物活性

Synthesis and biological activities of acetal analogs of 10-Me-Aplog-1, an anticancer lead derived from Aplysiatoxin

○早川 皓太郎[1]、花木 祐輔[1]、徳田 春邦[1]、柳田 亮[2]、中川 優[3]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]香川大農、[3]名大院生命農)

○ Koutaro HAYAKAWA[1], Yusuke HANAKI[1], Harukuni TOKUDA[1], Ryo YANAGITA[2], Yu NAKAGAWA[3], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Nagoya Univ.)

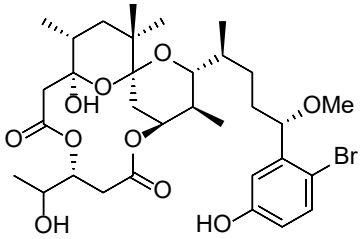
【研究背景・目的】

Aplysiatoxin (ATX) はアメフラシ由来の強力な protein kinase C (PKC) 活性化物質である。ATX は PKC の C1 ドメインに結合し、PKC を活性化することにより、がん細胞増殖抑制活性を示す。しかし、同時に発がん促進、炎症作用といった副作用を示すことから、ATX 自身を抗がん剤として用いることは困難である。本研究グループでは ATX の構造を論理的に単純化することによって、これらの副作用を取り除き、がん細胞増殖抑制活性を選択的に残したアナログである 10-Me-Aplog-1 (**1**) (Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem*. **2012**, *55*, 5614) の開発に成功している。**1** は ATX の脱ブロモ体を凌ぐがん細胞増殖抑制活性を示すことから、有望な抗がん剤シーズと言えるが、その合成には最長直線工程数で 23 段階必要であり、総収率は 1.1% にすぎない。そこで本研究では、**1** の 4 位炭素原子を酸素原子に置換した **2** を設計し、スピロ環とラクトン環の同時形成による合成段階数の短縮を試みるとともに、その生物活性を評価することを目的とした。

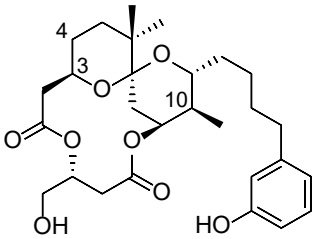
【結果と考察】

4 つのユニットを組み合わせる収束的な経路で、*m*-hydroxycinnamic acid から最長直線工程数 18 段階で **2** を合成することができた。しかしながら、スピロ環とラクトン環の同時形成反応において熱力学的に安定な 3 位エピマー (**3**) が優先的に生成したことから総収率の面を改善することはできなかった（**2**: 0.30%, **3**: 0.67%)。がん細胞増殖抑制およびアポトーシスに関係する PKC アイソザイム・PKCδ の C1B ドメインに対する結合能を調べた結果、**2** および **3** の結合能はそれぞれ **1** の 15 倍および 30 倍程度低かった。また、39 種のがん細胞株に対する増殖抑制能を評価した結果、いずれも **1** の増殖抑制能には及ばなかった。一方で、マウスの耳介に対する炎症作用を調べた結果、**1** と同様に **2** および **3** ともに炎症活性はまったく見られなかった。

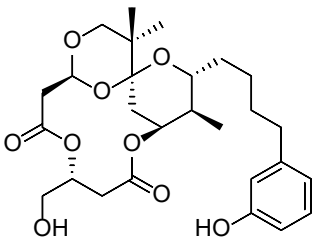
以上の結果より、**1** の PKCδ 結合活性およびがん細胞増殖抑制活性には 4 位付近の疎水性が重要である一方で、3 位の立体配置の寄与は比較的小さいことが示唆された。本知見は、**1** の構造最適化を行なう上で重要な基盤となるものである。



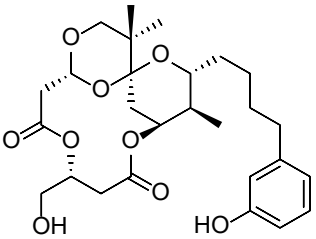
Aplysiatoxin (ATX)



10-Me-Aplog-1 (**1**)



2



3

protein kinase C, tumor-promoter, Aplysiatoxin

講演番号：2A15a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A15 会場

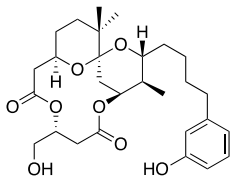
Aplysiatoxin 単純化アナログ・10-methyl-aplog-1 のがん細胞増殖抑制に関わる PKC アイソザイムの同定

Identification of the PKC isozymes involved in the anti-proliferative activity of 10-methyl-aplog-1, a simplified analog of aplysiatoxin

○花木 祐輔[1]、四方 雄貴[2]、菊森 将之[1]、堀田 夏紀[1]、井本 正哉[2]、入江 一浩[1]（[1]京大院農、[2]慶大理工）
○Yusuke HANAKI[1], Yuki SHIKATA[2], Masayuki KIKUMORI[1], Natsuki HOTTA[1], Masaya IMOTO[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Keio Univ.)

[背景・目的] Aplysiatoxin（ATX）は，細胞内情報伝達の鍵酵素・プロテインキナーゼ C（PKC）の活性化剤であり，強力な発がん促進性ならびに炎症性を示す．本研究グループでは，ATX の単純化アナログである 10-Methyl-aplog-1 (**1**) が発がん促進性や炎症性を示さず，特定のがん細胞株に対して ATX と同等以上の増殖抑制作用を示すことを見いだした（Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614）．また，aplog 類の PKC 結合能とこれらのがん細胞株に対する増殖抑制活性には高い相関が見られたことから，PKC 活性化を介した増殖抑制機構の存在が示唆された（Hanaki, Y. *et al*., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7636）．しかしながら，ATX および **1** が結合する PKC アイソザイムは 8 種類（α, βI, βII, γ, δ, ε, η, θ）存在する．本研究ではまず，**1** の細胞株選択的な増殖抑制活性に関与している PKC アイソザイムを同定することを目的とした．

[方法・結果] 9 種のヒトがん細胞株に対する増殖抑制活性を MTT 試験によって評価したところ，**1** は 3 種のがん細胞株（A549，SW620，Colo-205）の増殖を選択的に抑制した．さらに，FACS を用いた細胞周期解析の結果，**1** は A549 および SW620 の細胞周期を G1 と G2 期で停止させること，Colo-205 においてアポトーシスを誘導することが判明した．続いて，全自動キャピラリー電気泳動イムノアッセイシステム（Simple Western™）を用いて PKC アイソザイムの発現量を定量したところ，用いた 9 種のがん細胞株において PKCα と δ が高発現していた．siRNA を用いて A549 における PKCα の発現をノックダウンしたところ，**1** の増殖抑制活性は顕著に低下したのに対し，PKCδ ノックダウンの影響は小さかった．一方で，SW620 および Colo-205 においては，PKCα または δ のいずれか一方のノックダウンでは効果はなく，両者を同時にノックダウンした場合のみ **1** の増殖抑制活性が有意に低下した．以上より，**1** は PKCα および／または δ の活性化を介して細胞周期阻害やアポトーシスを引き起こすことが明らかになった（Hanaki, Y. *et al*., *BBRC* **2017**, in press）．しかしながら，各がん細胞株における PKCα および δ の発現量と，**1** に対する感受性との間には相関がないことから，下流のシグナル伝達分子の発現量や変異の有無が **1** の細胞株選択性を決定していると考えられる．



10-Methyl-aplog-1 (**1**)

Cell line	**PKCα**	**PKCδ**
A549	***Cell cycle arrest***	–
SW620	***Cell cycle arrest***	***Cell cycle arrest***
Colo-205	***Apoptosis***	***Apoptosis***
HCT116, HT29, LS174T, PC3, A375, A2058	–	–

Aplysiatoxin, PKC, tumor-promoter

発表責任者：入江　一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A15a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A15 会場

Bacillus cereus が産生する環状ドデカデプシペプチド，ホモセレウリドの合成と生物活性の検討
Synthesis and evaluation of homocereulide, macrocyclic depsipeptide isolated from Bacillus cereus

○奈賀 俊人[1,3]、服部 能英[2]、竹中 宏誌[2]、大田 洋一郎[2]、切畑 光統[2]、谷森 紳治[3] ([1]東食短大包装食品工学、[2]阪府大 BNCT 研究センター、[3]阪府大院生命環境)
○Toshihito NAKA[1,3], Yoshihide HATTORI[2], Hiroshi TAKENAKA[2], Yoichiro OHTA[2], Mitsunori KIRIHATA[2], Shinji TANIMORI[3] ([1]Toyo College of Food Technology, [2]Osaka Pref. Univ. center for BNCT, [3]Osaka Pref. Univ.)

【背景および目的】Cereulide (**1**) および Homocereulide (**2**) は、共に *Bacillus cereus* の培養液中に産生される環状ドデカデプシププチドであり(Fig. 1)、Cereulide (**1**)は嘔吐型食中毒の原因毒素であることが報告されている。[1)]

一方、Homocereulide（**2**）は、当初、海洋性セレウス菌の培養液から殺腫瘍細胞活性物質として単離されたが、その嘔吐毒性については明らかにされていない。[2)] 両者の化学構造を比較すると、**1** の（*2S*)-バリン酸（L-*O*-Val）部は、**2** では（*2S*)-*allo*-Ile 酸(L-*O*-*allo*-Ile)に替り、他のアミノ酸およびヒドロキシ酸の種類および立体構造は同一である。また、Cereulide (**1**)の全合成とそれによる構造確認は磯部らにより達成されたが、Homocereulide (**2**)の全合成は未達成である。本研究は、Homocereulide（**2**）の全合成を液相フラグメント縮合法により達成して構造確認を行うと共に、その生物活性、特に嘔吐毒性について検討することを目的とする。

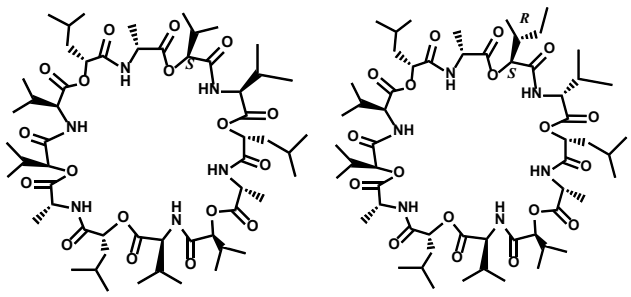
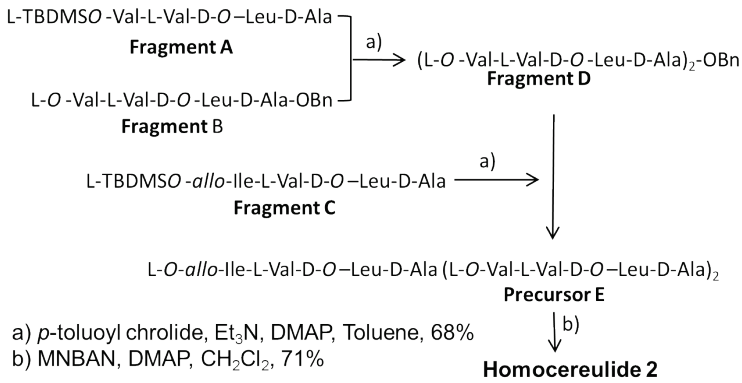


Fig. 1 Chemical strucrure of cereulide and homocereulide

【方法および結果】入手容易な L－および D－アミノ酸を出発原料とし、光学活性なα－ヒドロキシ酸類は対応するアミノ酸の立体構造を保持したまま調製した。テトラデプシペプチドである 3 種のフラグメント A, B、および C を活性化エステル法で段階的に縮合して直鎖状のドデカデプシペプチド前駆体に導き、これを、MNBAN を用いる分子内環化反応に附して 32 員環を構築し、目的とする Homocereulide (**2**)を 19 段階、全収率 4.9%で合成した（Scheme 1）。[4)] 合成した **2** の LC-TOFMS 分析による溶出時間および質量スペクトルは天然物と一致した。また、^{1}H、^{13}C、HMQC、HMBC NMR スペクトルは、目的とする構造を支持した。現在、合成品を用いた HEp-2 培養細胞に対する毒性評価を検討している。



Scheme 1 Synthesis of homocereulide **2**

1) Agata *et al.*, (1994) *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 31-34. 2) Uemura *et al.*, (1995) *Chem. Lett.*, **24**, 791-792. 3) Isobe *et al.*, (1995) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 2855-2858. 4) Naka *et al.*, (2017) *Peptide Science 2016*, 61-62.

Homocereulide, emetic toxin, organic synthesis

発表責任者：谷森紳治（tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A15a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A15 会場

アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成

Design and synthesis of ß-strand-fixed peptides inhibiting aggregation of amyloid ß

○田中 郁也、柴田 果奈、増田 裕一（三重大生物資源）
○Fumiya TANAKA, Kana SHIBATA, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

【背景・目的】

アルツハイマー病の原因物質である 42 残基のアミロイドβ (Aβ42) は、分子間で β-シートを形成して凝集し (図 1) 、神経細胞毒性を示す。Aβ42 の分子間 β-シートに結合し、その伸長を阻害する短鎖ペプチドは β-シートブレーカーペプチド [1] と呼ばれ、アルツハイマー病治療戦略の 1 つとなることが期待されている。我々は、短鎖ペプチドの立体配座を β-ストランドに固定すると、Aβ42 の β-シートと相互作用しやすくなると考えた。本研究では、Aβ42 の凝集を阻害する β-ストランド配座固定ペプチドを設計・合成することを目的としている。

【方法・結果】

ペプチドの n 番目と n+2 番目のアミノ酸側鎖を (*E*)-アルケンにより連結した 17 員環トリペプチドは、β-ストランド状に配座固定されることが報告されている [2] 。そこで、Aβ42 の LVFFA を鋳型とし、n 番目と n+2 番目のアミノ酸側鎖を連結した配座固定ペプチド (図 2) を設計した。本ペプチドの合成は、液相ペプチド合成法により 2, 4 番アミノ酸側鎖にアリル基を持つペプチドを 5 残基まで伸長させた後、オレフィンメタセシス反応で環化することにより行った。現在、合成したペプチドの凝集活性試験を行っている。

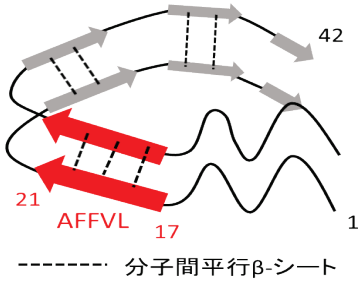


図 1　Aβ42 の凝集体の立体構造 [3]

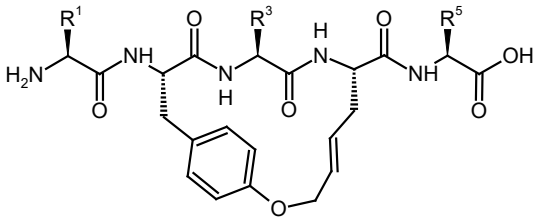


図 2　β-ストランド配座固定ペプチド

【引用文献】

1) Soto, C. *et al*., *Nat. Med*. **1998**, *4*, 822.
2) Abell, A. D. *et al*., *J. Org. Chem*. **2009**, *74*, 4354.
3) Morimoto, A. *et al*., *J. Biol. Chem*. **2004**, *279*, 52781.

amyloid ß, ß-sheet, Alzheimer's disease

発表責任者：増田 裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

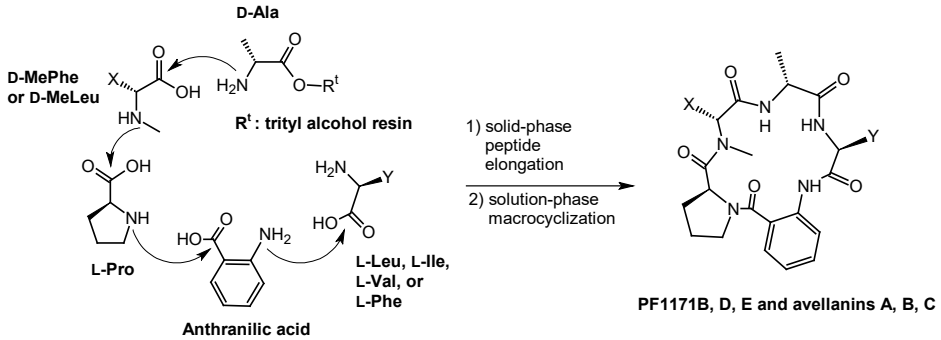
講演番号：2A15a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A15 会場

環状ペプチド PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類の全合成と生物活性評価
Total synthesis and biological evaluation of PF1171B, D, E, and avellanins A, B, C

○本田 将也、増田 裕一（三重大生物資源）
○Masaya HONDA, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

【背景と目的】PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類 (図) は、子嚢菌 *Hamigera* 属が生産する 5 残基の環状ペプチドであり、アントラニル酸や *N*-メチルアミノ酸などの非タンパク質構成アミノ酸を有している[1,2,3]。PF1171 ペンタペプチドではモルモットの強心作用[1]とアポリポプロテイン B (apoB) の産生抑制活性[1]が、avellanin A と B ではマウスの血圧上昇活性[2]が生物活性として報告されており、その活性発現機構に興味がもたれる。本研究では、類縁体合成を指向して、PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類の固相法を用いた全合成を行った。

【方法と結果】合成経路は、我々が過去に確立した PF1171 ヘキサペプチドの合成法[4]を参考にした。即ち、ペプチド鎖の伸長を Fmoc 固相法により行い、固相から切り出した鎖状ペプチドを液相で環化させることで、PF1171B, D, E と avellanin A, B, C の全合成を達成した (図) 。合成した類縁体について Hep G2 細胞における apoB 産生抑制活性を評価した結果、PF1171B, D および avellanin A, B, C は apoB の産生を顕著に抑制した。



PF1171	X	Y
B	D-MePhe	L-Leu
D	D-MeLeu	L-Leu
E	D-MeLeu	L-Ile

avellanins	X	Y
A	D-MePhe	L-Ile
B	D-MePhe	L-Val
C	D-MePhe	L-Phe

図．PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類の固相法を用いた全合成

【引用文献】

1. Umagome, K. *et al*., *Japan Kokai Tokkyo Koho* **Jan. 26, 1999**, 11-21297.
2. Yamazaki, M. *et al*., *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2122.
3. Igarashi, Y. *et al*., *J. Antibiot. (Tokyo)* **2015**, *68*, 707.
4. Masuda, Y. *et al*., *J. Org. Chem*. **2014**, *79*, 7844.

cyclic peptide, solid-phase synthesis, apolipoprotein B

発表責任者：増田 裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A15a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A15 会場

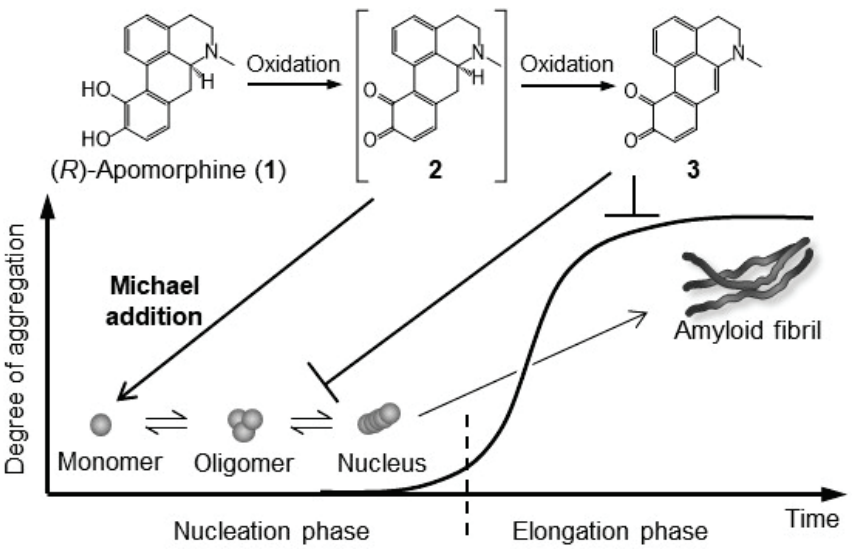
アポモルフィンによるアミロイド β 42 凝集抑制機構の解析

Inhibitory mechanism of apomorphine against amyloid ß 42 aggregation

○花木 瑞穂[1]、村上 一馬[1]、片山 寿美枝[2]、赤木 謙一[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]医薬基盤研)
○Mizuho HANAKI[1], Kazuma MURAKAMI[1], Sumie KATAYAMA[2], Ken-ichi AKAGI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NIBIOHN)

【背景と目的】 アルツハイマー病（AD）の原因物質の一つである 42 残基のアミロイド β タンパク質（Aβ42）は，凝集中間体であるオリゴマーが強い細胞毒性を示す．Aβの凝集は AD 発症の初期段階で起こることから，その凝集を抑制する化合物は AD の予防薬として期待される．本研究グループはこれまでに，カテコール構造を有するアポモルフィン（**1**）の自動酸化によって生じる *o*-キノン体（**2**）と平面性の高い酸化体（**3**）が，Aβ42 の凝集阻害に関与している可能性を報告した[1]．本研究では，**2** および **3** による Aβ42 の凝集抑制機構を NMR および LC-MS/MS 解析により詳細に解析した．

【方法と結果】 本研究者らによる先行研究から[2]，*o*-キノン構造を有する **2** および **3** は，Aβ42 のリシン残基と Michael 付加する可能性が考えられた．LC-MS 解析の結果，**2** と Aβ42 との付加体形成を確認した．さらに，毒性コンホマーに配座を固定した Aβ 誘導体・E22P,M35Mox-Aβ9-35 を用いて MS/MS 解析を行ったところ，Lys16 あるいは Lys28 において共有結合を形成していることが明らかになった．一方で，**3** は Aβ42 と付加体を形成しなかった．続いて，^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC NMR により Aβ42 モノマーと **2** あるいは **3** の相互作用部位を調べた．**2** の存在下では Aβ42 の Arg5 および分子間 β シート領域に位置する His14, Gln15, Lys16, Leu17, Phe19 付近で化学シフトが変化したが，**3** と Aβ42 モノマーとの相互作用は観測されなかった．そこで，**3** による Aβ42 の凝集過程（核形成および線維伸長段階）への影響を詳しく調べるため，1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol（HFIP）で処理した Aβ42 に対する凝集抑制活性を調べたところ，**3** は線維伸長段階のみならず核形成過程も阻害した．これより，**3** は Aβ42 モノマーではなくオリゴマーからなる凝集核と相互作用している可能性が示唆された．以上のように，**1** は酸化の進行度によって，標的となる Aβ42 の凝集度とその作用機構が異なることが明らかとなった．



【参考文献】
1) 佐藤ら, 2013 年度日本農芸化学会大会.
2) M. Sato *et al., J.Biol.Chem.* 288, 23212 (2013).

amyloid ß, aggregation, apomorphine

講演番号：2A15a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A15 会場

青ジソに含まれるアミロイドβ42 の凝集阻害物質の作用機構とマウスにおける生体内代謝

Mode of action of an inhibitory compound against amyloid ß42 aggregation in green perilla and its in vivo metabolism

○坂口 嘉紀[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、泉尾 直孝[2]、小澤 裕介[2]、粟野 達也[3]、高部 圭司[3]、川瀬 泰司[4]、廣瀬 賢治[4]、三羽 伸明[5]、久米 利明[5]、清水 孝彦[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農食品、[2]千葉大院医、[3]京大院農森林、[4]ウォーターズ、[5]京大院薬)

○Yoshiki SAKAGUCHI[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Naotaka IZUO[2], Yusuke OZAWA[2], Tatsuya AWANO[3], Keiji TAKABE[3], Taiji KAWASE[4], Kenji HIROSE[4], Nobuaki SAMPA[5], Toshiaki KUME[5], Takahiko SHIMIZU[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Food Sci.Agri.Kyoto Univ., [2]Chiba Univ., [3]Forest Agri.Kyoto Univ., [4]Waters, [5]Pharma.Sci..Kyoto Univ.)

【背景・目的】 アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 42 残基のアミロイドβ (Aβ42) は，主として分子間βシート構造をとることにより凝集（オリゴマー化：2～24 量体：dimer or trimer x *n*）し，神経細胞毒性を示す．これより，Aβ42 の凝集を抑える食品や漢方薬に含まれる機能性成分は，AD 予防に有効と考えられる．これまでに本研究グループは，凝集抑制に不可欠な構造因子として，カテコール構造ならびに平面性を明らかにした.[1] 近年，赤池ら（京大院薬）は 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone（DDC：下図）を青ジソ (*Perilla frutescens var. crispa f. viridis*) の抽出液から初めて単離・同定し，DDC の強い抗酸化作用および抗炎症作用を明らかにした.[2] DDC はカテコール構造をもつことから，Aβ42 の凝集能に対する効果についても興味がもたれた．本研究では，DDC の Aβ42 に対する凝集抑制能を明らかにし，その作用機構を LC-MS およびイオンモビリティー質量分析法 (IM-MS) で調べた．さらに，DDC の体内動態に関する知見を得るため，マウス体内における代謝動態について解析した．

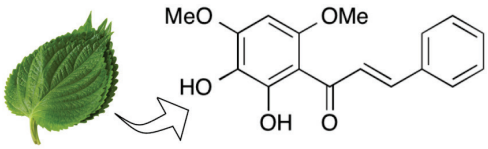


図 青ジソに含まれる DDC

【方法・結果・考察】2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxyacetophenone を出発物質として Dakin 反応を行なった後，cinnamoyl chloride を用いた Friedel-Crafts アシル化反応によって DDC を得た．Aβ42 の凝集抑制能は，チオフラビン T (Th-T) 蛍光試験，HPLC を用いた遠沈試験，透過型電子顕微鏡によって評価した．その結果，DDC は濃度依存的に Aβ42 の凝集を抑えるだけでなく (IC_{50} = 11 μM)，形成されるフィブリルの量が減少した．その強さは，カテコール構造を有するタキシフォリン等 (IC_{50} = 15~30 μM) に比べて強かった.[1] また，LC-MS と IM-MS 測定から，DDC の代謝物と Aβ42 がシッフ塩基を形成していること，衝突誘起解離 (CID) による MS/MS 実験からその結合残基は K16 および K28 であること，さらに DDC は Aβ42 の 2 量体以上の形成を抑制していることが判明した．

次に，DDC を野生型マウスに経口投与 (100 mg/kg) し，30 分後の脳，血液，小腸における吸収ならびに代謝を LC-MS で調べたところ，血液と小腸中だけでなく脳内にも、DDC の硫酸およびグルクロン酸抱合体が含まれていることが判明した．タキシフォリンを投与した場合には、脳内でこれらの抱合体および未変化体が検出された．これまでフラボノイドは，痕跡量の未変化体としての脳移行の報告が多かったが，野生型マウスの場合，その多くは抱合化されている可能性がある．

1) 村上，入江, *Dementia Japan.* **2017**, *31*, 351.　2) Izumi, Y. *et al., Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 669.

amyloid ß, aggregation, MS/MS

講演番号：2A16a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A16 会場

9-Anthracenyl 基導入型フルオラス GH 2nd 触媒の合成と閉環メタセシス反応

Synthesis of Fluorous GH 2nd Catalyst Bearing 9-Anthracenyl Group, and Ring Closing Metathesis Reaction

○五十嵐 里奈、下脇 健斗、小林 佑基、塩入 孝之、松儀 真人（名城大農）
○ Rina IGARASHI, Kento SHIMOWAKI, Yuki KOBAYASHI, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

【目的】メタセシス反応は、非極性の多重結合同士から炭素－炭素結合を形成できる有用な反応であり、Grubbs-Hoveyda 2nd generation **1a** が触媒として汎用されている (**Figure 1**)。当研究室では、**1a** のスチレン型二座配位子上に疎水性電子求引基を導入することで、配位子骨格の「配座制御」や「電子密度制御」を利用した触媒の高活性化を試みてきた。分子内 CH/π 相互作用による「配座制御」を利用した触媒として、R^1 部位に 1-Naph や 9-Anth を導入した **1b**, **1c** [1]、「電子密度制御」を利用した触媒として、R^2 部位に電子求引性基である C_8F_{17} タグを導入した触媒 **1d** [2] を合成し、これらの触媒が **1a** よりも高活性であることを見出している。加えて、これらの活性化法を組み合わせた、R^1 部位に 1-Naph、R^2 部位に C_8F_{17} タグを有する触媒 **1e** が、単一の活性化法を利用した **1b**, **1d** に比べ高い活性を示すことを明らかにしている [3]。本研究では、9-Anth 導入型触媒 **1c** の R^2 部位に C_8F_{17} タグを導入することでさらに触媒活性が向上する可能性があると考え、フルオラス触媒 **1f** を合成し、触媒活性を調べた。

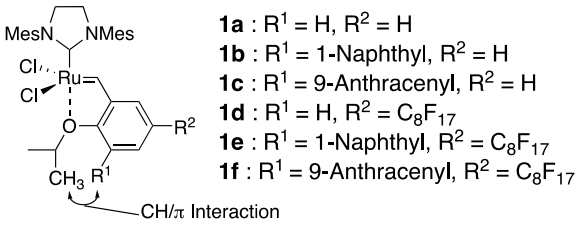


Figure 1

【実験と結果】当研究室で開発したペルフルオロアルキル化反応 [4] を含む 6 段階反応を経て、触媒 **1f** を合成した。**1f** の触媒活性は、重クロロホルム中にて三置換オレフィンを与えるジエン体 **2** を基質とした閉環メタセシス反応をおこない、^{1}H NMR 追跡により変換率を算出した。その結果、**1f** は触媒 **1c**, **1d** よりも低い活性を示したが、市販触媒 **1a** よりも高い活性を示すことがわかった (**Figure 2**)。

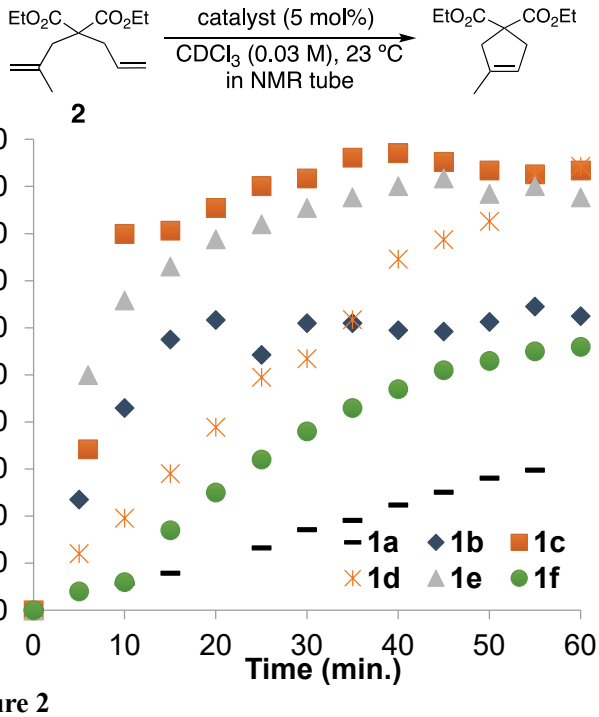


Figure 2

【References】1) Matsugi, M. *et al. Synlett* **2016**, *27*, 2352. 2) Matsugi, M. *et al. J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7905. 3) Matsugi, M. *et al. Synthesis* **2017**, *49*, 1796. 4) Matsugi, M. *et al. Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4189.

metathesis, CH/π interaction, fluorous tag

講演番号：2A16a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A16 会場

固相-液相間移動型フルオラス有機分子触媒の開発: スルホンアミドを有するミディアムフルオラスプロリン触媒の合成、及び移動能の確認

Development of Solid-Liquid Phase Transfer Fluorous Organocatalyst: Synthesis of Medium Fluorous Proline Catalyst Bearing Sulfonamide moiety, and Confirmation of Transferability

○後藤 万智子、杉山 祐也、枝川 静華、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○ Machiko GOTO, Yuya SUGIYAMA, Shizuka EDAGAWA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

【目的】これまでに我々は、ミディアムフルオラス含量の Grubbs-Hoveyda 2nd generation 触媒が、反応媒体との疎水性制御により、固相(Teflon ®)-液相(MeOH)間を任意に移動可能であることを見出し、効率的なメタセシス反応系の構築に成功している。[1] 本触媒を Teflon ® に担持した固相触媒は、有機溶媒中では触媒が溶解し均一系で反応が進行する。一方、反応終了後、系中に水を添加すると触媒は不溶化し、再度 Teflon ® に担持され、ろ過操作のみで簡便に回収し、再利用できる。今回我々は、ミディアムフルオラス分子の機能を有機分子触媒に付与することを計画した。有機分子触媒としては、不斉アルドール反応などに有用なプロリン触媒を用いることにした。まず、本フルオラス触媒の均一/不均一化条件を検討するために、L-プロリン由来のミディアムフルオラスプロリンを合成し、固相-液相間移動能を調べた。

【実験と結果】出発原料 *trans*-4-hydroxy-L-proline (**1**) から AIBN を用いたラジカル反応を鍵反応とし、鍵中間体 (**2**) を経て、フルオラスタグを 4 位に導入したミディアムフルオラスプロリン (**3**) を 6 段階で合成した。FluoroFlash ® に担持させた **3** は、MeOH 中、溶媒組成変化により固相-液相間の任意移動が可能であることがわかったが、高含水率条件が必要であった (20% MeOH aq.) (**Figure 1**)。そこで、脂溶性を上げるためにスルホンアミドを有するミディアムフルオラスプロリン (**6**) を **2** から合成した。ビストリフルオロメチルベンゼンを有するスルホンアミド (**4**) と縮合したのち、脱保護をおこない目的とする **6** を得た (**Scheme 2**)。得られた **6** の相関移動能を確認した結果、溶媒として Toluene を用いれば、フルオラスパウダーに担持した **6** は、固相-液相間の任意移動が効率よく達成できることが確認できた。

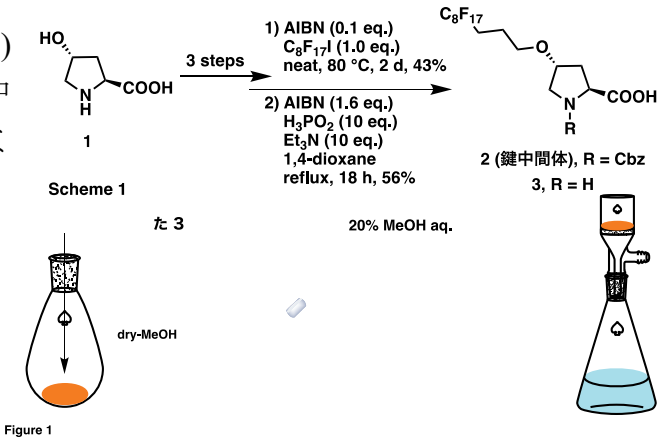
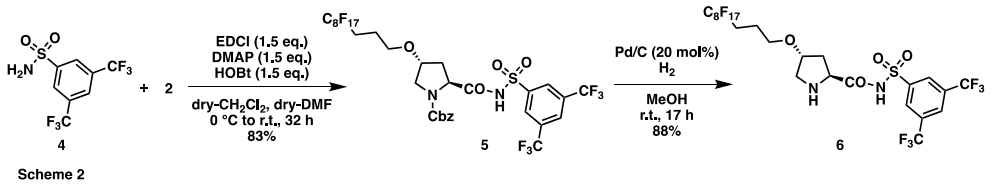


Figure 1



Scheme 2

【Reference】1) Matsugi, M. *et al*. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1363.

mediumfluorous, proline, phase transfer catalyst

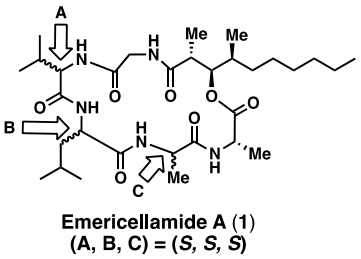
講演番号：2A16a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A16 会場

Emericellamide A のフルオラスミクスチャー合成 ： 立体異性体のフラグメント合成

Fluorous Mixture Synthesis of Emericellamide A : Fragment Synthesis of Stereoisomers

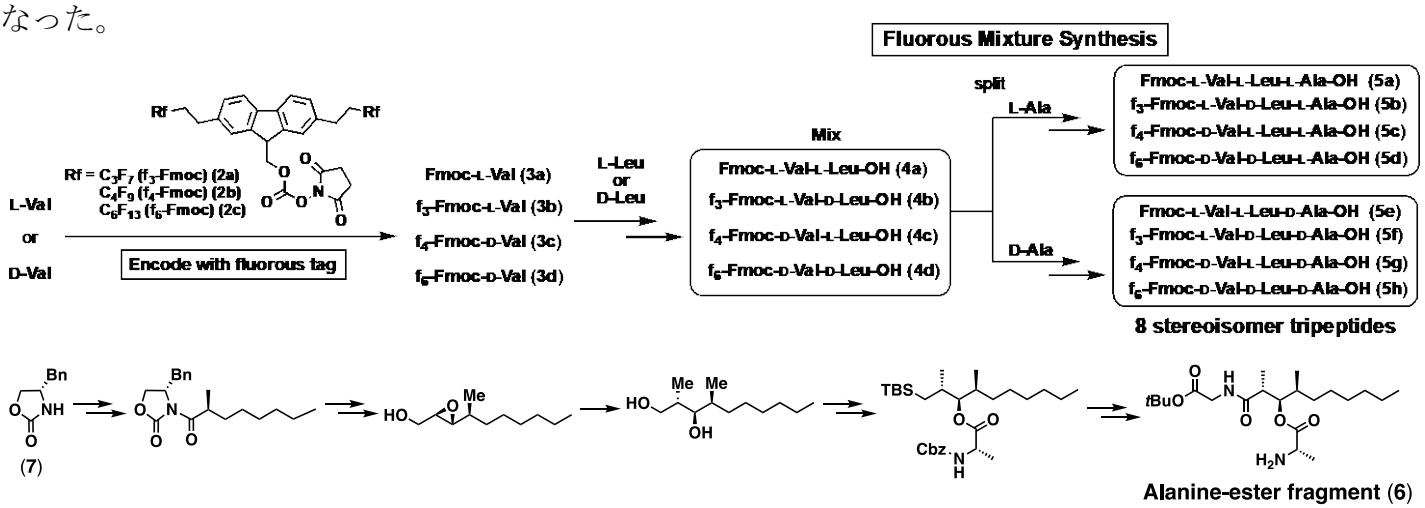
○白井 竜平、伊藤 聖人、小栗 一真、杉山 祐也、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○Ryuhei SHIRAI, Masato ITO, Kazuma OGURI, Yuya SUGIYAMA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

含フッ素化合物は、フッ素含量の違いに基づき、Fluorous Solid Phase Extraction[1] により簡便に分離できる。フッ素含量の異なる Fluorous Fmoc (f-Fmoc) 試薬[2] を用いて異なるアミノ酸を保護した後、これらを混合してスプリット型のミクスチャー合成をおこなえば、多種多様なペプチド類の液相コンビナトリアル合成 (Fluorous Mixture Synthesis: FMS) が可能となる。[3] 我々は、トリペプチド部位とアラニンエステル誘導体部位から構成される生物活性物質 Emericellamide A (**1**) [4] 及びその立体異性体を FMS により一挙に合成することを計画し、**1** のフラグメント合成及びフラグメント同士の縮合反応を試みた。



Emericellamide A (1)
(A, B, C) = (*S*, *S*, *S*)

フッ素含量の異なる f-Fmoc 試薬 (**2a-c**) で保護した L-バリン (**3a, b**) ならびに D-バリン (**3c, d**) と、絶対配置の異なるロイシンをそれぞれ縮合させジペプチド体 (**4a-d**) を得た。**4a-d** の混合物を二等分し、L-アラニン及び D-アラニンと縮合させることでトリペプチド体の混合物 (**5a-d, 5e-h**) を得た。アラニンエステル誘導体部位 (**6**) は (*S*)-ベンジルオキサゾリジノン (**7**) を出発原料として 14 段階で合成した。次いでフラグメント同士の縮合反応をおこなった。



1) Matsugi, M. Curran, D. P. In *Fluorous Chemistry*; Otera, J., Eds. ; CMC Publishing, 2005; p 43.
2) Matsugi, M. *et al*. *QSAR Comb. Sci*. **2006**, *25*, 713. 3) Matsugi, M. *et al. Synthesis* **2017**, *49*, 2187.
4) Ghosh, S. *et al. Tetrahedron lett.* **2008**, *49*, 3697.

fluorous mixture synthesis, fluorous Fmoc reagent, Emericellamide A

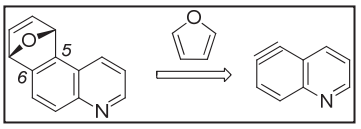
講演番号：2A16a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A16 会場

キノリンから誘導したアライン中間体による環化付加反応
Cycloaddition of aryne intermediate derived from quinoline

○小玉 彩友美、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院農）
○Satomi KODAMA, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

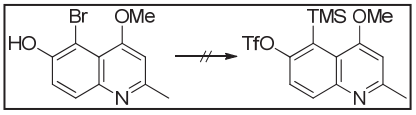
【目的】

キノリンの 5 位と 6 位が炭素で置換されているアルカロイド系天然物の化学合成に取り組んでいる。5 位―6 位間でアライン中間体を発生させ、一挙に置換基を導入する新規合成法の開発を目指している。本研究では、キノリン誘導体からアライン中間体を発生させ、環化付加反応によるオキサビシクロ化合物の合成を目的とした。

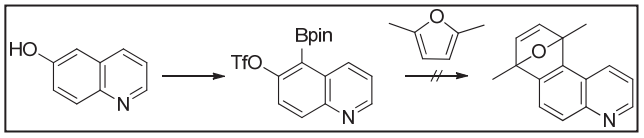


【方法・結果】

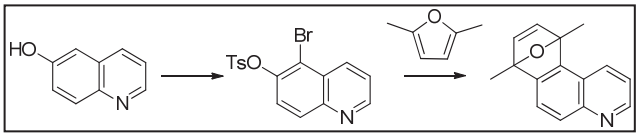
はじめにアライン前駆体としてオルトシリルトリフラート化合物を設定した。しかしながら、目的とする前駆体が合成できなかった。これは隣接するメトキシ基による立体障害により目的とする TMS 基が導入できなかったと考えられた。



そこで、出発物質を 6 ヒドロキシキノリンに変更し、ホウ素化した化合物をアライン前駆体として合成した。しかしながら、アラインを発生させる条件で処理しても、目的とする環化付加物は得られなかった。



これまでの合成前駆体を利用してオルトブロモトシラート化合物をアライン前駆体として合成した。この化合物を *t*-BuLi で処理したところ、アライン中間体が生成し、フランと環化付加反応が進行しオキサビシクロ環が縮環したキノリンが得られた。



以上の結果より、キノリンの 5,6 位でアライン中間体を発生させる前駆体と、反応条件を見出し、フランとの環化付加反応によって、キノリンと縮環したオキサビシクロ化合物を合成することに成功した。

quinoline, aryne, cycloadditione

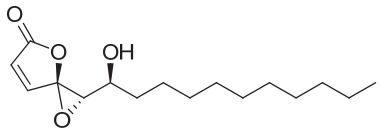
講演番号：2A16a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A16 会場

ビニロガス向山アルドール反応を利用したブテノリド骨格の構築

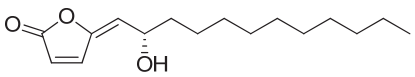
Synthesis of butenolides by using vinylogous Mukaiyama aldol reaction

○森口 舞子、久世 雅樹、滝川 浩郷 (神戸院農)
○Maiko MORIGUCHI, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

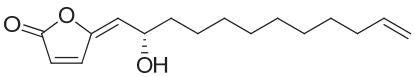
【目的】我々はアルキリデンブテノリド骨格を持つ ramariolide 類の合成を達成してきた[1)]。しかしながら、アルキリデン部分の *E*/*Z* 選択性が低いことが問題となっている。そこで本研究では、ブテノリド骨格を構築するビニロガス向山アルドール反応、及びそれに続くアルキリデン部分を構築する脱離反応の立体選択性を向上させることを目的とした。



Ramariolide A

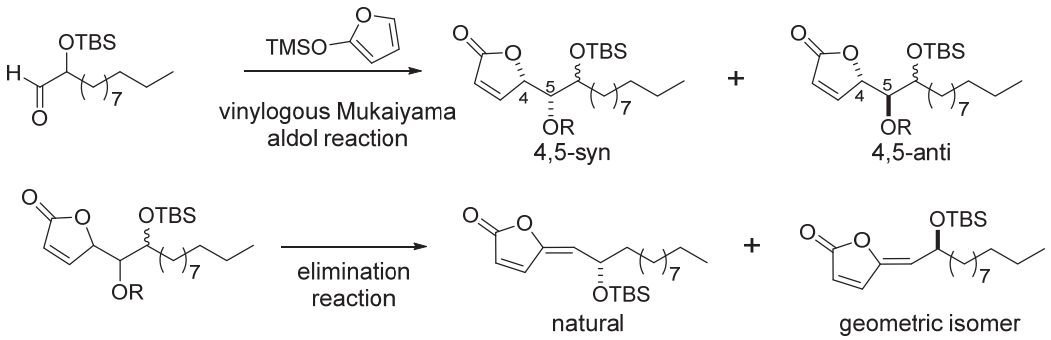


Ramariolide C



Ramariolide D

【方法・結果】まずビニロガス向山アルドール反応におけるジアステレオ選択性について詳細な検討を行った。触媒として $BF_3 \cdot OEt_2$ を用いると syn 体が優先し、CsF を用いると anti 体が優先されることが分かった。さらに、MeLi を用いることで anti 体のみを選択的に得ることができた。次に脱離反応における *E*/*Z* 選択性についても検討した。これまでに TBAF/AcOH 条件下では選択性が低くなることがわかっている。Et_3N を用いても選択性は向上しなかったが、*t*-BuOK を用いることで選択性を向上させることができた。



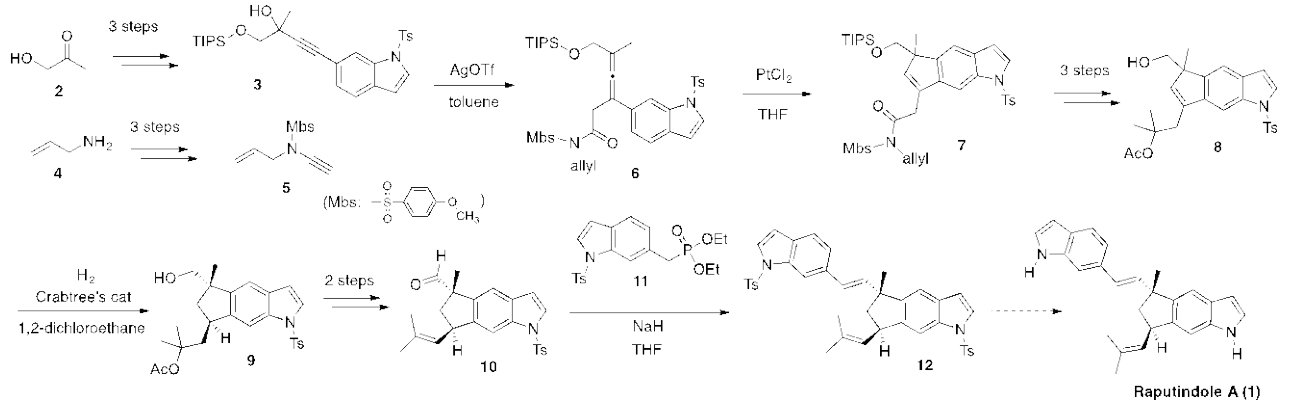
文献 1 ：Kuse, M.; Moriguchi, M.; Hachida, M.; Takikawa, H. *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1409-1411.

butenolides, vinylogous Mukaiyama aldol reaction, elimination

講演番号：2A16a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A16 会場

ラプチンドール A の全合成研究
Synthetic study on raputindole A
○中野 広暁[1]、神谷 真鈴[2]、菅 敏幸[2]、江木 正浩[1,2] ([1]静岡県大食、[2]静岡県大薬)
○Hiroaki NAKANO[1], Marin KAMIYA[2], Toshiyuki KAN[2], Masahiro EGI[1,2] ([1]School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, [2]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】
ラプチンドール A (**1**) は、アマゾンに自生する *Raputia simulans* Kallunki (Rutaceae) の幹や根から採取された天然有機化合物である。リン酸化酵素 GSK-3β に対する阻害効果が報告されているため、糖尿病やアルツハイマーなどの疾病発症を抑制することが期待されている。ジヒドロインデン及び インドール骨格を併せ持つ三環性構造を如何にして立体的に構築するかが合成ルートの鍵となる。本研究では、三環性骨格の構築に当研究室で開発したアレン形成反応と分子内環化を用いて、ラプチンドール A の全合成研究に取り組んだ。
【方法・結果】
はじめに hydroxyacetone (**2**) 、allyl amine (**4**) から既知の方法により **3**、 **5** へとそれぞれ導いた。続いて当研究室で開発したアレン形成反応を行ったところ、インドール環や嵩高い置換基をもつ **3** においても **5** との反応は室温で良好に進行し、四置換アレン **6** を与えた。アレンの分子内環化では反応点の制御が問題であったが、インドールの窒素保護基を最適化することで目的の環化体 **7** を単一化合物として得ることに成功した。側鎖の変換、脱保護を経て **8** を合成した後、二重結合の還元を検討した。水酸基のキレーション効果を利用して二重結合を還元すれば、立体選択的に反応が進行すると考えた。触媒を精査した結果、Crabtree 触媒を用いる還元反応は天然物と同じ立体をもつ **9** のみを与えること分かった。脱水及び酸化反応により **10** へと変換、別途調製した **11** を連結することで **12** を得た。現在、最終工程の脱トシル化、光学活性な **3** を用いる合成ルートに取り組み、ラプチンドール A の不斉全合成達成を目指している。



raputindole A, tetrasubstituted allene, selective reduction

発表責任者：江木正浩（egi@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A16a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A16 会場

スチリルクマリン類の合成および構造活性相関
Synthesis of styrylcoumarins and their structure activity relationship
○柳川 達哉[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Tatsuya YANAGAWA[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】従来の創薬研究では、分子内に生理活性発現部位を一つだけ持つ天然資源由来化合物をリード化合物として精力的な研究が行われてきた。その結果、新規構造の枯渇が問題化している。そこでこれまで明らかにされている生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子を合成し、新たな生物活性の発現や活性増強を探索する研究に注目が集まっている。本研究では、抗菌活性、抗腫瘍活性、細胞増殖抑制活性などの多様な生物活性を示すクマリン骨格とがん抑制効果があることが報告されているスチルベン骨格の両骨格を有する複合分子について検討することとした。

これまでに当研究室では、クマリンースチルベン複合分子として 3-フェニルクマリンに着目し、その合成を行った。3-フェニルクマリンは、スチルベンにみられる 2 つのフェニル基うち一方がクマリン骨格ベンゼン環、他方はクマリン骨格外の 3 位フェニル基、さらに両者を結ぶエチレン部分がクマリンラクトン環二重結合とする複合分子である。すなわち、クマリン骨格中にスチルベン骨格のうちベンゼン環とエチレン部分が内包された構造である。数種の 3－フェニルクマリン類を合成し、その生物活性を調べたところ顕著な活性は認められなかった。クマリン骨格中にスチルベン骨格のベンゼン環部分とエチレン部分が内包されているため、顕著な活性を示さなかった考察した。

本発表では、より生物活性の強い複合分子の創出を目指して、クマリン骨格中にスチルベン骨格の一方のベンゼン環のみ内包されるクマリンースチルベン複合分子として、スチリルクマリン類の系統的合成を試みた。

【方法】本研究では、サリチルアルデヒド類を出発物質とし、DMF 溶媒中ピリジン存在下でオルト酢酸トリメチルと加熱攪拌し、数種のメチルクマリン類を合成した。これを CCl_4 溶媒下、NBS と触媒量 AIBN による Wohl-Ziegler 反応によって臭素化し、これをトルエン溶媒中で PPh_3 と加熱還流することでそのメチル基をホスホニウム塩化した。これをベンズアルデヒド類と DMF 溶媒中、NaOMe 存在下 Wittig 反応により、スチリルクマリン類をシス体／トランス体の混合物として合成した。両者をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離して、シスーおよびトランスースチリルクマリン類を得た。

【結果】天然資源由来の生理活性スチルベン類は酸素官能基としてメトキシル基を持つものが多く報告されていることより、本研究ではスチリルクマリン類のメトキシル体の中心に合成を行った。これらの生物活性については、現在検討中である。

Styrylcoumarins, HL-60, Structure activity relationship

講演番号：2A16a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A16 会場

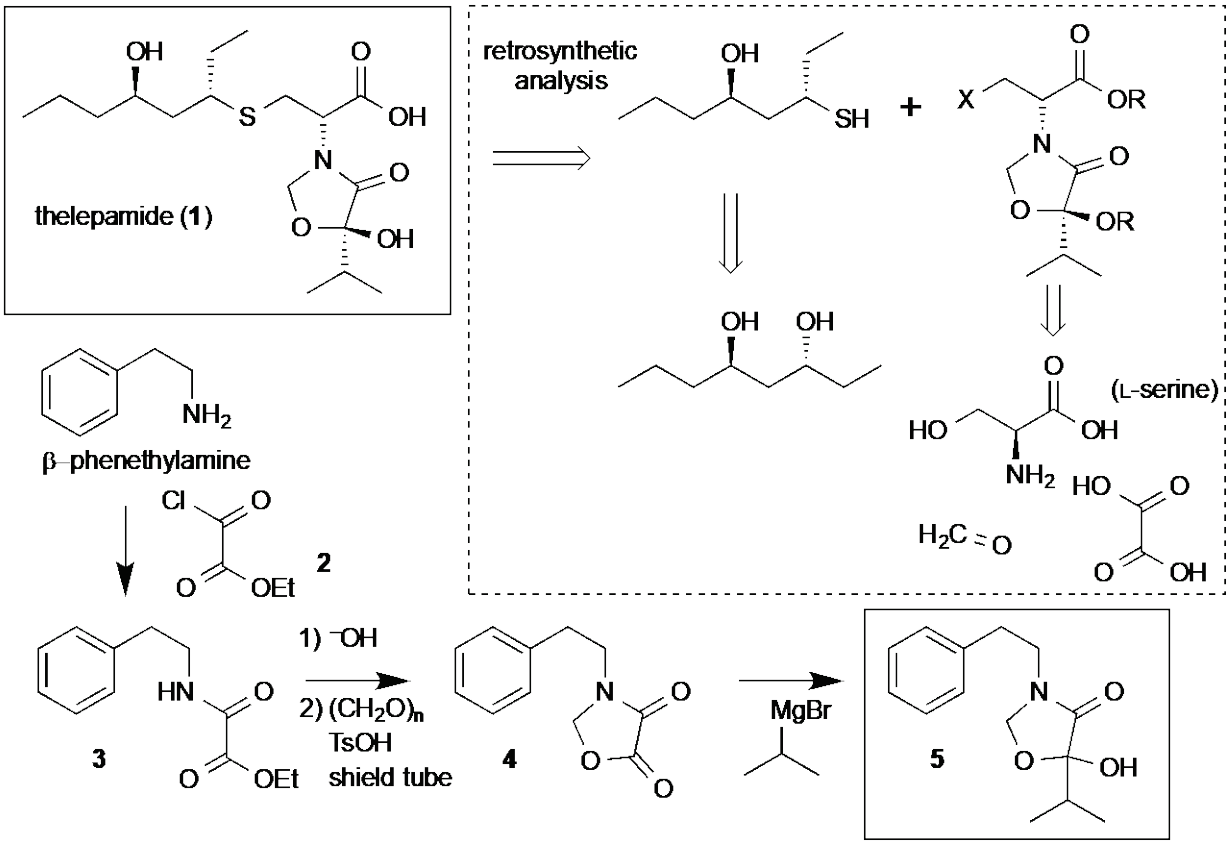
海洋環形動物より単離された Thelepamide の合成研究

Synthetic studies of thelepamide

○小出 祐実、井田 浩介、泉 実、清田 洋正（岡山大院・環境生命）
○Yumi KOIDE, Kosuke IDA, Minoru IZUMI, Hiromasa KIYOTA (Okayama Univ.)

海洋環形動物 *Thelepus crispus* から単離された thelepamide（**1**）は、オキサゾリジンとアミノ酸の縮合物がポリケチドとスルフィド結合している類例のない骨格を有し，抗白血病細胞活性を示すことから注目されている[1]。我々は，**1** の全合成達成と絶対立体配置決定を目的に合成研究を展開している。モデル化合物の合成と全合成の経過について報告する。

β-Phenethylamine と酸クロリド **2** の縮合によってハーフアミド **3** を調製した。エステル部の選択的加水分解を行った後に，ホルムアルデヒドとの環化反応を耐圧試験管中で行い、環化物 **4** を得た。**4** に対して Grignard 反応を行うことでオキサゾリジン環モデル **5** の合成に成功した。



[1] J. Rodríguez *et al.*, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 464.

oxazolidine, marine annelid worm, organic synthesis

発表責任者：清田洋正（kiyota@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A16a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A16 会場

抗腫瘍物質 Sanctolide A の合成研究

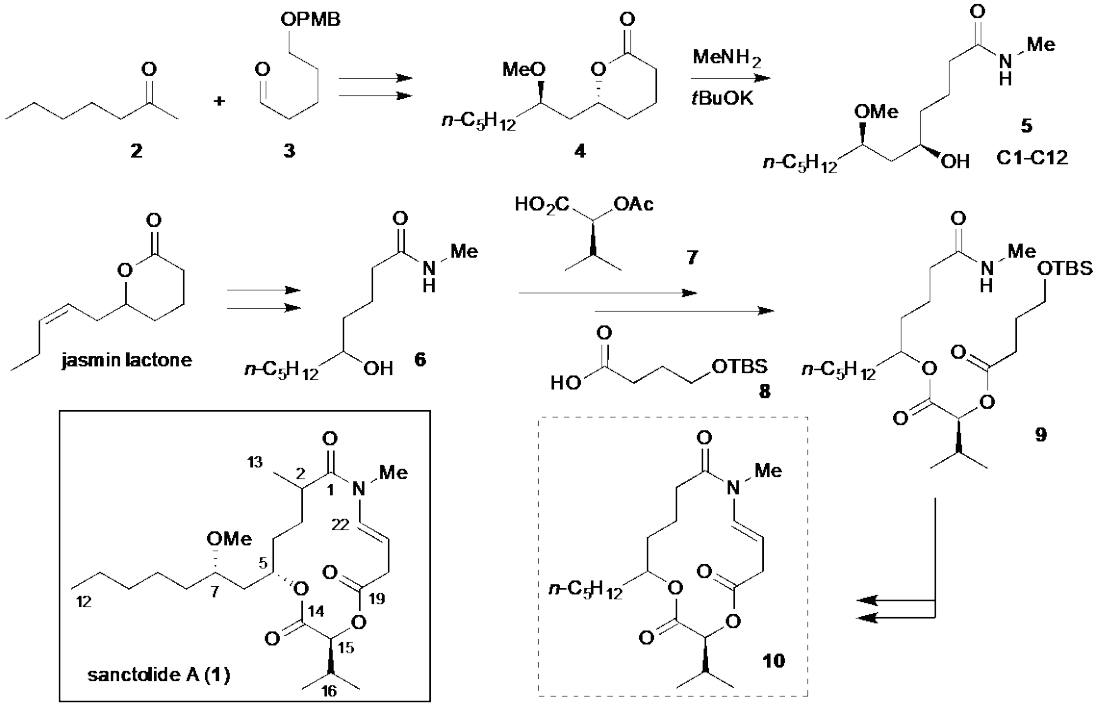
Synthetic studies of sanctolide A

○清田 洋正、田中 善將、平田 智大、長尾 実佳、泉 実 (岡山大学・環境生命)
○Hiromasa KIYOTA, Yoshimasa TANAKA, Tomohiro HIRATA, Mika NAGAO, Minoru IZUMI (Okayama Univ.)

2010 年 Kang らが藍藻類 *Oscillatoria sancta* の培養液から単離した sanctolide A (**1**, 2.6 mg/8L) は、抗腫瘍活性(殺 brine shrimp、LD_{50} ＝ 23.5 μM)を示す[1]。ポリケチド-非リボソームペプチド混成体(PK-NRP)である **1** の構造は、分解および新 Mosher 法、*J*-分割 HMBC 法などによって決定されたが、2 位の絶対立体配置は不明である。我々は **1** の構造活性相関解明を目的に全合成研究を行っている。

2 と **3** のアルドール反応と TEMPO 酸化を鍵反応に構築したラクトン **4** を methylamine で開環して、C1-C12 単位 **5** を合成した。

次に 14 員環構築をモデル化合物を用いて検討した。Jasmin lactone から導いたアミド **6** と L-valine から調製したカルボン酸 **7**、続いてカルボン酸 **8** と縮合して **9** を得た。**9** から脱 TBS 化および酸化で得られるアルデヒドを酸処理したところ、望む *E* 型で環化したエナミドモデル **10** の合成に成功した。



[1] H. S. Kang *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3563.

non-ribosomal peptide, organic synthesis, polyketide

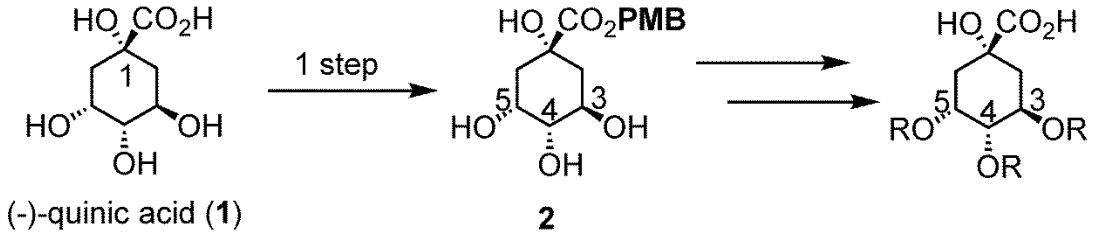
発表責任者：清田洋正（kiyota@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A16a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A16 会場

アミロイド線維形成を阻害するアシル化キナ酸類の合成第二法
Synthesis of acylquinic acids possessing inhibitory effect of amyloid fibril formation II

○石原 健広[1]、尾山 公一[2]、重光 佳基[3]、天野 名都子[3]、廣明 秀一[3]、近藤 忠雄[4]、吉田 久美[4] ([1]名大院情報科学、[2]名大物国セ、[3]名大院創薬、[4]名大院情報学)
○ Takehiro ISHIHARA[1], Kin-ichi OYAMA[2], Yoshiki SHIGEMITSU[3], Natsuko TENNO[3], Hidekazu HIROAKI[3], Tadao KONDO[4], Kumi YOSHIDA[4] ([1]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [2]RCMS., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Phar. Sci., Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. Info., Nagoya Univ.)

【目的】カフェオイルキナ酸は、アルツハイマー病の原因とされるアミロイド線維の形成を阻害し脳の神経細胞を保護する働きがある[1)]。本研究では、この阻害機構を明らかにすることを目的に、多様なアシル化キナ酸類を効率的に合成する方法の確立を目指した。昨年度の本大会で遊離カルボン酸を用いたアシル化反応によるトリアシル化キナ酸の新規合成法とアミロイド線維形成阻害活性を報告した[2)]。今回、トリアシル化キナ酸の精製方法を改良し、通算収率を向上させることができた。これに加え、本方法を用いてテオガリン(**7**)と5-カフェオイルキナコール(**8**)を合成したので報告する。
【方法と結果】(−)-キナ酸 (**1**)の 1 位カルボン酸だけを PMBCl と TBAF を用いて保護する条件を見出し **2** を得た。**2** に 4~5 当量の芳香族有機酸と EDCI/DMAP を作用させトリアシル化体を得た。これらのトリアシル化体の保護基すべてをルイス酸を用いて一挙に脱保護し、トリアシル化キナ酸 **3**-**6** を合成した。以前の脱保護反応においては収率が 16～39%と低かったが [2)]、今回、精製方法を改良して 60～71%に収率を向上させることができた。同様の経路により **7**, **8** もそれぞれ通算収率 20, 25%で合成した。現在、アミロイド線維形成阻害効果を調べている。



(-)-quinic acid (**1**)　**2**　**7**　**8**

No.	R	overall yield (%)
3	cinnamoyl	57
4	*p*-coumaroyl	52
5	caffeoyl	52
6	galloyl	40
7	galloyl	20
8	caffeoyl	25

1) Miyamae, Y., et al., *Bioorgan. Med. Chem.,* **2012**, *20*, 5844-5849.
2) 石原健広他, 日本農芸化学会 2017 年度大会.

synthesis of 3,4,5-tri-O-acylquinic acids, theogalin, amyloid formation inhibitors

講演番号：2A16a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A16 会場

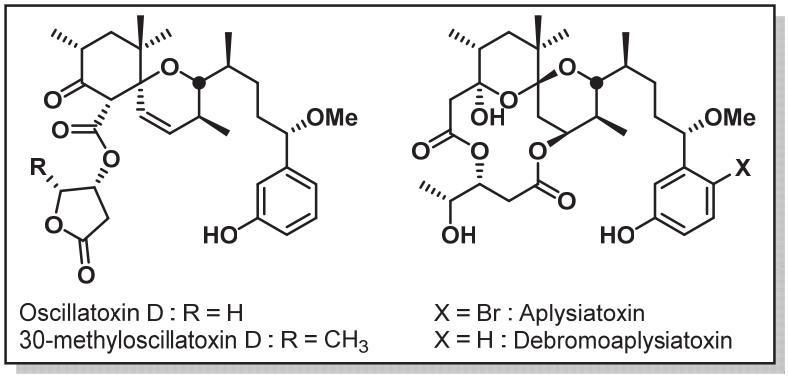
Oscillatoxin D と Aplysiatoxin の統一的合成法の開発

Development of Unified Synthetic Method for Oscillatoxin D & Aplysiatoxin

○新木 悠介、野倉 吉彦、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yusuke ARAKI, Yoshihiko NOKURA, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

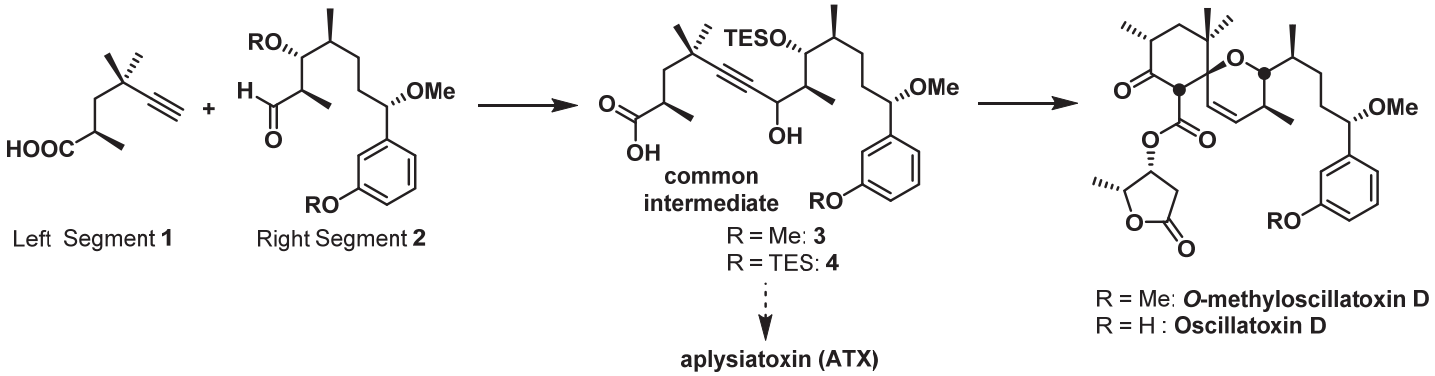
【背景と目的】

Oscillatoxin D と aplysiatoxin は海洋性シアノバクテリアより単離されたポリケチド天然物である [1]。Aplysiatoxin はプロテインキナーゼ C (PKC)を強力に活性化し発がん促進作用を示すことが知られている。一方、oscillatoxin D の生物活性は、その入手の困難さ故ほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、これら両化合物群を合成する統一的な方法を開発することを第一の目的とした。次いで oscillatoxin D の未解明な生物活性について明らかにすることを目指す。



【方法と結果】

昨年度の農芸化学会では、**1** と **2** から中間体 **3** を経て、*O*-methyloscillatoxin D を合成したことを報告した [2]。今回保護基の違う中間体 **4** を合成し、oscillatoxin D の全合成を目指した。さらに、**3** を共通中間体とし aplysiatoxin の合成も進めた。



References
1) Moore, R. E. *et al. J. Org. Chem*. **1985**, *50*, 1255-1259.
2) a) Nishikawa, T. *et al. Org. Lett.* **2017**, *19*, 5992-5995. b) 日本農芸化学会2017年度大会4C12a08

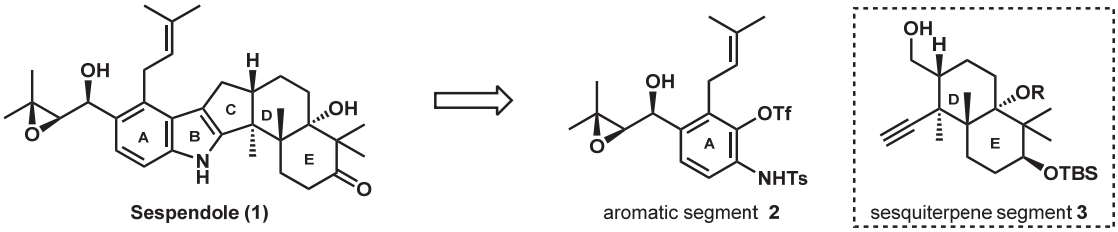
oscillatoxin, aplysiatoxin, natural product synthesis

講演番号：2A16a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A16 会場

セスペンドールの合成研究
Synthetic studies on Sespendole
○小野 義貴、植木 佳織、JITTRA Suthiwong、西川 俊夫（名大院生命農）
○Yoshiki ONO, Kaori UEKI, Suthiwong JITTRA, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

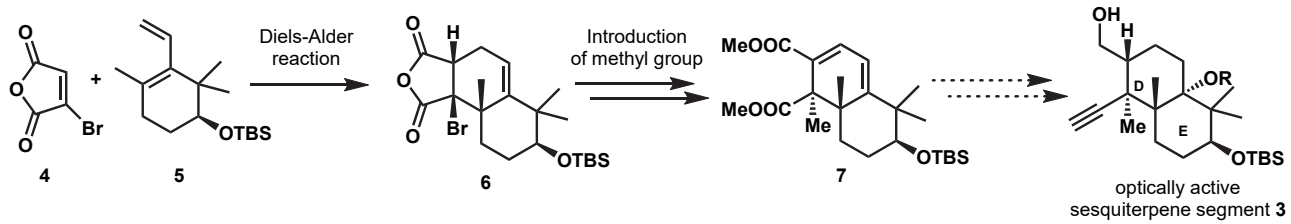
【背景と目的】

Sespendole (**1**) は，2004 年に Tomoda らによって糸状菌 *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 から単離されたインドールアルカロイドで，マクロファージの泡沫細胞化を抑制することが知られており，動脈硬化予防剤のリード化合物として期待されている [1]。しかし，天然からの供給量はごく微量であり，詳細な生物活性試験のための量的供給と複雑な五環性骨格の新規構築法の開発を目的として全合成研究を展開している。合成計画は, A 環を含む aromatic segment **2** と DE 環を含む sesquiterpene segment **3** をそれぞれ合成し，合成の最終盤で BC 環を一挙に構築するというものである。既に当研究室では **2** の不斉合成 [2] および **3** のラセミ体合成 [3] が完了している。本発表では **3** の光学活性体合成を目的として研究を行ったので報告する。



【結果】

求ジエン **4** と光学活性ジエン **5** との Diels-Alder 反応によって **6** を合成した。続くジアステレオ選択的なメチル基の導入によって 2 つの連続した第四級不斉炭素の構築に成功し **7** を得た [4]。現在 sesquiterpene segment **3** への合成を検討中である。



Reference
1) Tomoda, H. *et al*. *J. Antibiot*. **2006**, *59*, 338.　2) 日本農芸化学会年 2017 年大会 4C12a06
3) Sugino, K. *et al. Synlett*. **2011**, *5*, 647.　4) 日本農芸化学会年 2017 年大会 4C12a07

total synthesis, indole alkaloid, sespendole

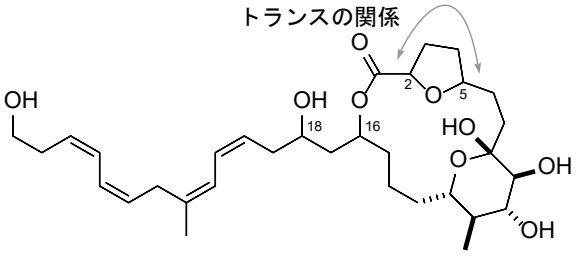
発表責任者：小野義貴（ono.yoshiki@f.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A16a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A16 会場

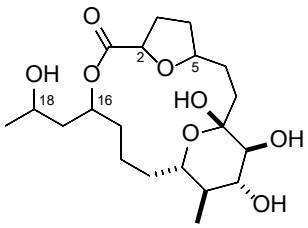
計算化学的手法によるホルモサリド A の構造推定

The computer-aided structure of formosalide A

○占部 大介（富山県大工）
○Daisuke URABE (Toyama Pref. Univ.)



ホルモサリドA



計算に用いたホルモサリドAの簡略化分子

【背景】ポリケチドは、抗がん活性や抗菌活性など創薬研究において魅力的な生物活性を有する天然物群である。特に大環状構造を持つポリケチドの中には重要な生物活性を持つ化合物が多く存在する。しかし、その複雑さのため構造決定は容易ではない。渦鞭毛藻 *Prorocentrum sp.* から単離されたホルモサリド A は、ヒト T リンパ球性白血病由来細胞とヒト大腸腺癌由来細胞に対して強い毒性を示すポリケチドである [1]。NMR 解析により、ホルモサリド A はテトラヒドロフラン環とテトラヒドロピラン環を含む 17 員環エステルとポリエンを含む側鎖上に、9 つの不斉中心が存在する事が明らかにされた。しかし、配座変換が早い大環状構造のため NMR 解析が困難となり、C2, 5, 16, 18 位の立体化学が未決定であった。そこで我々は、計算化学的手法を用いた包括的な配座探索とエネルギー計算、NMR 計算によりホルモサリド A の構造を推定する計画を立てた。

【方法および結果】立体化学が不明な 4 つの不斉中心のうち、C2, 5 位がトランスの関係であると報告されていることを考慮すると、ホルモサリド A の構造は 8 つの可能な異性体の中から決定すればよいことになる。我々は、ホルモサリド A の簡略化分子を設定し、該当する 8 つの異性体の NMR 計算と DP4+解析 [2]によりホルモサリド A の構造を推定した。具体的には、8 つの異性体に対して、分子力場計算/半経験的軌道計算/DFT 計算による包括的な配座探索、DFT 計算による各配座のポテンシャルエネルギー算出、DFT 計算による各配座の NMR 計算、配座のポテンシャルエネルギーに基づく NMR 値平均化、予測 NMR 値とホルモサリド A の実測 NMR 値の DP4+解析を行った。その結果、8 つの異性体のうち 1 つの異性体が 100%の確率でホルモサリド A の構造であるという結論を得た。発表では詳細な計算化学的手法とホルモサリド A の推定構造について議論する。

【参考文献】1) Lu, C.-K.; Chen, Y.-M.; Wang, S.-H.; Wu, Y.-Y.; Cheng, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1825; 2) (a) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946; (b) Grimblat, N.; Zanardi, M. M. Sarotti, A. M. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12526.

structure determination, computer chemistry, macrolide

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A16a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A16 会場

腎線維化抑制活性を有する Cochlearol A の合成研究

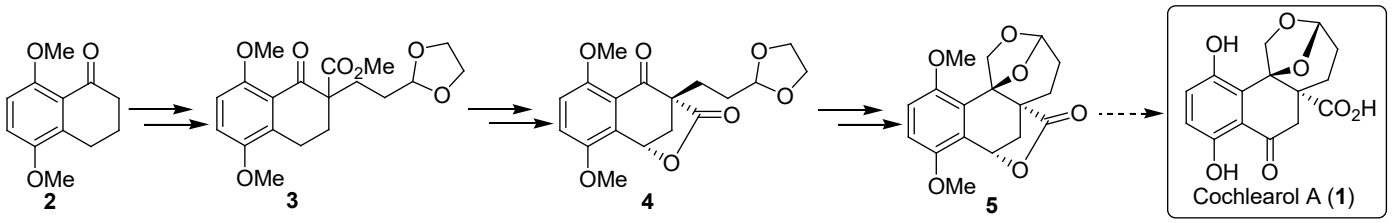
Synthetic study of cochlearol A, an inhibition of renal fibrosis

○鳴瀬 和美[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2]、渡邉 秀典[1]、石神 健[2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東農大・生命)

○ Kazumi NARUSE[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2], Hidenori WATANABE[1], Ken ISHIGAMI[2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of agriculture)

【目的】　古来より民間療法において使用されてきたマンネンタケ科のキノコからは、近年抗腫瘍活性や殺虫活性といった、様々な生物活性を示す化合物が単離されてきている。Cochlearol A は、マンネンタケ科の *Ganoderma cochlear* より単離されたメロテルペノイドであり、Smad2 と Smad3 のリン酸化の抑制活性を有することが報告されている[1)]。これらの転写因子は、腎線維化を促進する TGF-β のシグナル伝達に関与していることが知られている。従って本化合物は、慢性腎臓病の治療薬のリード化合物として期待が持てると考え、合成研究に着手することとした。

【方法・結果】　本化合物の合成において鍵となるのは、天然には珍しいジオキサスピロ[4.5]デカン骨格を含む 5/6/6/6 縮環ならびに架橋構造の構築である。まず既知の手法に従い、*p*-ジメトキシベンゼンより Friedel-Crafts アシル化および Wolff-Kishner 還元によりテトラロン **2** を調製した。続いてメトキシカルボニル基の導入とアクロレインへの共役付加などを経て、ケトエステル **3** を得た。次にジオキサスピロ環の構築を検討したが、立体障害のためにケトン部分への一炭素導入は困難であった。そこで、酸化的に 5 員環ラクトン **4** へと導いたところ立体障害が軽減され、一炭素導入が可能となった結果、ジオキサスピロ環を有する化合物 **5** の生成が確認され、望む 5/6/6/6 縮環構造の構築を達成した。現在は Cochlearol A への変換を検討中である。



1) M. Dou, L. Di, L.-L. Zhou, Y.-M. Yan, X.-L. Wang, F.-J. Zhou, Z.-L. Yang, R.-T. Li, F.-F. Hou, and Y.-X. Cheng, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 6064-6067.

cochlearol A, synthetic study, an inhibition of renal fibrosis

講演番号：2A16a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A16 会場

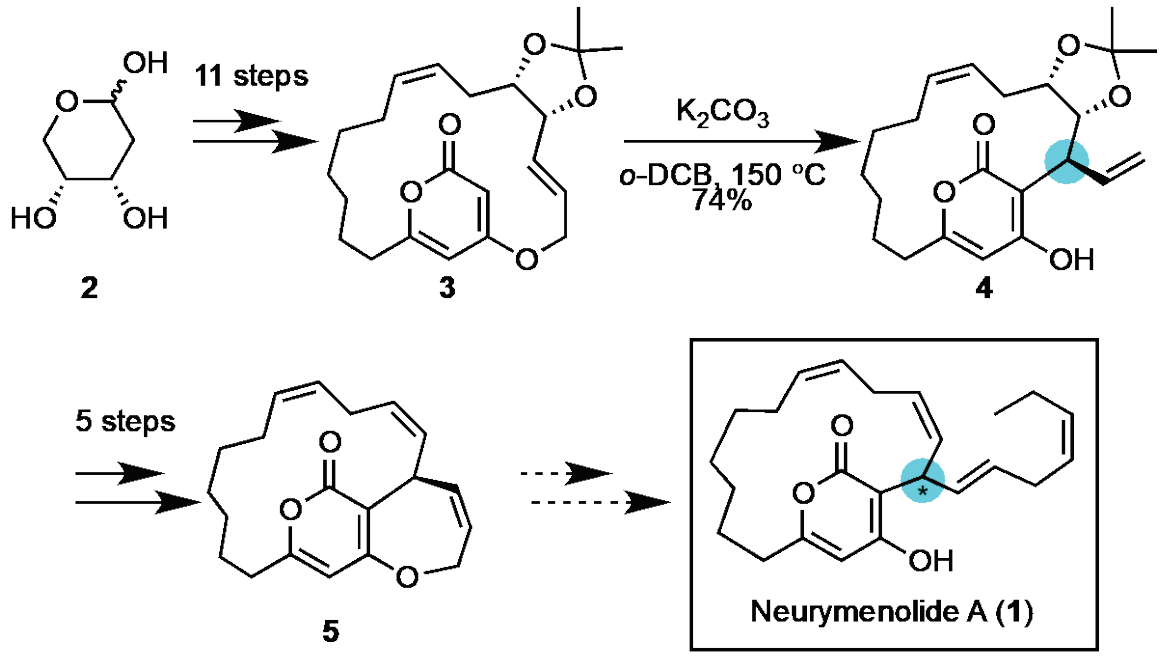
Neurymenolide A の合成研究

Synthetic study of Neurymenolide A

○増田 眞大、村瀬 哲司、桜井 なつ樹、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○ Masahiro MASUDA, Tetsuji MURASE, Natsuki SAKURAI, Hidenori WATANABE (The University of Tokyo)

【目的】Neurymenolide A(**1**)はフィジーの紅藻 *Neurymenia fraxinifolia* から単離された *α*-ピロンを有する大員環マクロライドであり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌に対する抗菌活性が報告されている。NMR スペクトルの解析により平面構造が決定されているものの、絶対立体配置は明らかとなっていない。そこで我々は立体化学の決定を目的とし Neurymenolide A (**1**)の不斉合成に着手した。

【方法と結果】2−デオキシ-D-リボース **2** から 11 工程の変換により大員環エーテル **3** へと導いた。**3** に対して Claisen 転位反応を行う事で Neurymenolide A (**1**)の大員環骨格を有した **4** を立体選択的に構築した。得られた **4** から 5 工程の変換により **5** を合成した。**5** から Neurymenolide A (**1**)への幾何異性をコントロールした 4 炭素伸長をモデル実験により成功したため報告する。



natural product, macrolide

講演番号：2A16p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A16 会場

ホモイソフラボノイドの合成および生理活性の検討

Study for synthesis and bioactivity of homoisoflavonoids

○金田 匡[1]、川井 悟[2]、吉澤 結子[3]、常盤野 哲生[3] ([1]秋田県立大生資科院、[2]東電大理工、[3]秋田県立大生資科)

○ Masashi KANETA[1], Satoru KAWAII[2], Yuko YOSHIZAWA[3], Tetsuo TOKIWANO[3] ([1]Akita Prefectural Univ. Grad. Sc., [2]Tokyo Denki Univ., [3]Akita Prefectural Univ.)

【目的・背景】

ホモイソフラボノイド化合物は､イソフラボンの B 環と C 環の間に 1 炭素導入された骨格を持ち、細胞毒性、抗菌活性、抗炎症活性、抗酸化活性などを有することが報告されている。生薬の麦門冬の主成分である Methylophiopogonanone は DPPH ラジカル消去活性、NO 産生阻害作用があり [1)]、セイヨウスモモから単離された Purunuside は α−グルコシダーゼ阻害活性を有している [2)]。また、*Vietnamese Caesalpinia sappan* から単離されたホモイソフラボノイドは HL-60 細胞の増殖阻害およびアポトーシス誘導が報告されている [3)]。ジフェニルプロパン型のフラボノイド化合物に比べると、ホモイソフラボノイド化合物は報告例が少なく、合成非天然物の研究例もあるものの、さらなる構造活性相関の研究が必要であると考えられる。

本研究では、種々の官能基を有するホモイソフラボノイドを合成して生理活性試験を行い、生理活性情報の取得および各化合物間の比較を目的とした。

【実験方法および結果】

ヒドロキシ基またはメトキシ基を有するケイ皮酸誘導体と、トリアルコキシベンゼンとの Friedel-Crafts アシル化反応によりジヒドロカルコン体を合成した。続いて、ジヒドロカルコンに Vilsmeier 試薬を作用させて 1 炭素導入と同時に C 環を形成することで、ホモイソフラボン骨格を構築した。続いて、置換基導入による構造修飾を目的として、合成したホモイソフラボンの A 環 6 位または 8 位に、プレニル基またはハロゲンの導入を試みた。A 環上への *C*–プレニル化は *O*–プレニル基からの Claisen 転位または直接導入により行った。ハロゲン化については *N*–Chlorosuccinimide との反応により塩素を導入した化合物を合成した。

現在、合成化合物について HL-60 増殖抑制、α−グルコシダーゼ阻害およびリパーゼ阻害活性試験を検討しており、詳細について報告する。

1) Li, N. *et al., Fitoterapia* **2012**, *83(6)*, 1042-1045.

2) Kosar, S. *et al., Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32(12)*, 1705-1710.

3) Tran, M, H. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2013**, *77*(*12*), 2378-2382

homoisoflavonoid, α-glucosidase, lipase

発表責任者：常盤野哲生（tkwn@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2A16p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A16 会場

酵素による不斉還元を鍵段階とする、海産天然物 Hamigeran B の合成研究

Synthetic study on hamigeran B, based on enzyme-catalyzed asymmetric reduction

○須貝 威、桑田 和明、藤田 理愛、花屋 賢悟、東林 修平 (慶應大薬)
○Takeshi SUGAI, Kazuaki KUWATA, Rie FUJITA, Kengo HANAYA, Shuhei HIGASHIBAYASHI (Keio Univ.)

海綿の一種 *Hamigera tarangaensis* より単離されたジテルペンの一つである hamigeran B (**1**) は、ウイルスに対し増殖阻害活性を示す興味深い化合物である [1]。我々は三か所の不斉中心を含む五員環部分構造に着目し、キラルビルディングブロックとして(*S*)-5-hydroxymethyl-2-isopropyl-5-methylcyclopent-1-ene-1-yl trifluoromethylsulfonate (**2**)を設計し、その調製と **1** の合成への応用を検討することとした。

ビニルトリフラート **2** は ethyl 2-oxocyclopentanecarboxylate (**3**)を出発原料として合成した。まず、単離酵素スクリーニングキット (ダイセル社：キラルスクリーン® OH) で **3** の不斉還元を試みた。いずれの酵素も *cis* 体の ethyl 2-hydroxycyclopentanecarboxylate (**4**)を与えた。優れた選択性と反応性を示した三種類のうち、E001 を用いて不斉還元をスケールアップした。単離した(1*R*,2*S*)-**4** の α 位を既報 [2]を参考に立体選択的にメチル化後、イソプロピル基およびトリフリル基の導入を経て、望む不斉四級炭素を有する **2** へと導いた。

ビニルトリフラート **2** と 2-(2-formyl-3-methoxy-5-methylphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (**10**)[3]の鈴木カップリングは、**2** の遊離ヒドロキシ基がホウ酸エステルを形成するにとどまった。一方、**2** を酸化して調製した(*R*)-5-formyl-2-isopropyl-5-methylcyclopent-1-en-1-yl trifluoromethylsulfonate (**9**)と **10** のカップリングでは、カップリング体 **11** が 1:1 の回転異性体混合物として得られた。混合物をそのまま SmI_2 と反応させたところ、分子内ピナコールカップリングにより 1-Isopropyl-6-methoxy-3a,8-dimethyl-2,3,4,5-tetrahydro-3a*H*-cyclopenta[a]naphthalene-4,5-diol (**12**)が得られ、三環性骨格の構築に成功した。このうち (3a*R*,4*R*,5*R*)-**12** を分離し、アルコールをシリル基およびアセチル基で保護した。四置換オレフィンへの水素付加はパラジウム炭素を触媒として加圧下で進行し、天然化合物と同じ立体化学を持つ生成物が得られ、同時にベンジル位の酸素官能基が加水素分解された。アルコール保護基の脱保護、酸化を経て、Clive らの既知合成中間体 [4]である(1*R*,3a*R*,9b*R*)-1-Isopropyl-6-methoxy-3a,8-dimethyl-2,3,3a,9b-tetrahydro-1*H*-cyclopenta[a]naphthalene-4,5-dione (**14**) に誘導し、**1** の形式全合成を達成した。

1) Wellington, *et al*., *J. Nat. Prod*. **2000**, *63*, 79.; 2) Kuwata, *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28*, 964.;
3) Gao, *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9942.; 4) Clive, Wang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2773.

asymmetric reduction, carbonyl reductase, Suzuki-Miyaura coupling

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

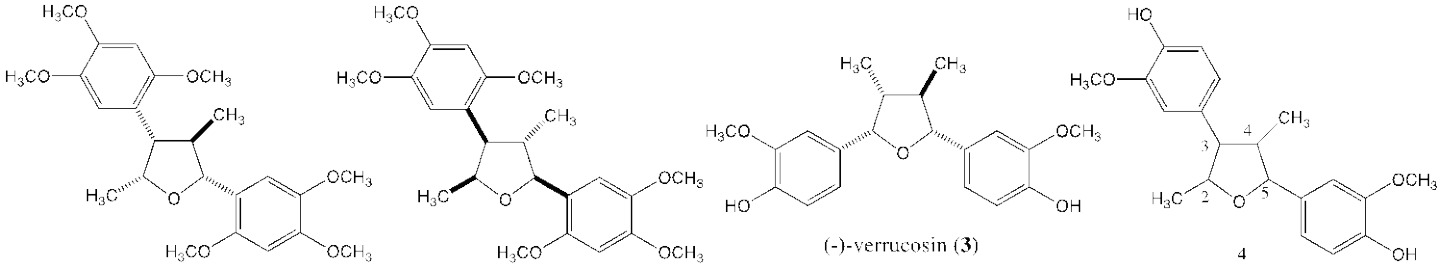
講演番号：2A16p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A16 会場

2,4-dimethyl-3,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran の立体異性体の合成

Syntheses of stereoisomers of 2,4-dimethyl-3,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran

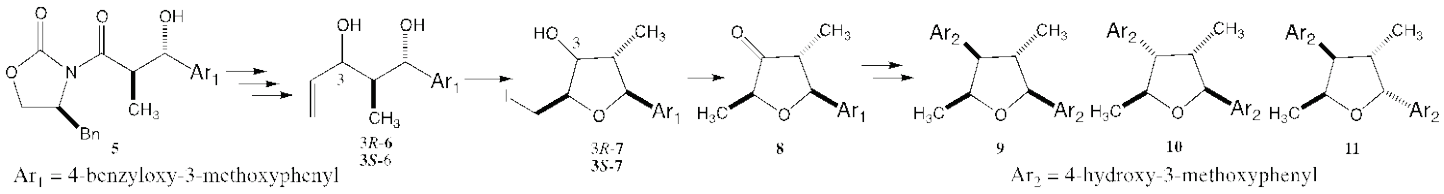
○田窪 竜明[1]、西脇 寿[2]、山内 聡[2] ([1]愛媛大、[2]愛媛大院農)
○Tatsuaki TAKUBO[1], Hisashi NISHIWAKI[2], Satoshi YAMAUCHI[2] ([1]Ehime Univ, [2]Graduate School of Agriculture)

目的）テトラヒドロフラン環の 2 位と 4 位にメチル基が、3 位と 5 位に Aryl 基が結合しているテトラヒドロフラン型リグナンは、フェニルプロパノイド単位の 7 位と 8'位が結合し、8 位と 7'位間が酸素で結ばれているネオリグナンである。magnosalicin (**1**, **2**)は、このタイプの構造を持っている。我々の研究室では､テトラヒドロフラン環の 3 位と 4 位にメチル基を､2 位と 5 位に Aryl 基を有するナツメッグの成分である (-)-verrucosin (**3**)に細胞毒性活性および植物生長調節活性を見出し誘導体の合成を行って、構造と活性との関係を示した。今回は、テトラヒドロフラン環上の置換基の位置と立体構造が生物活性に与える影響を調べることを目的として、2,4-dimethyl-3,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)tetrahydrofuran 化合物 **4** の立体異性体の合成方法の確立を目的として実験を行った。



magnosalicin (**1** and **2**)

方法、結果）Evans の *anti* アルドール縮合物 **5** を再結晶後、水酸基を TIPS 基で保護した後、不斉補助基の除去、アルデヒドへの酸化、vinylMgBr との反応、脱保護を行い、ジオール **6** を得た。次に、I_2 を用いた分子内エーテル化を行いジアステレオマーの分離によりテトラヒドロフラン環 **7** を主立体異性体として得た。$LiAlH_4$ 還元によって還元的にメチル基に変換した後、酸化を行ってケトン体 **8** とした。さらに、4-benzyloxy-3-methoxyphenyllithium との反応を行い、生じた 3 級水酸基の除去を ZnI_2 存在下 $Cl(CH_2)_2Cl$ 中で行い、脱ベンジル化を行ったところ、5 位のベンジル位がエピ化したと考えられる立体異性体を含む **9**, **10**, **11** が得られた。



Lignan, Tetrahydrofuranlignan, Magnosalicin

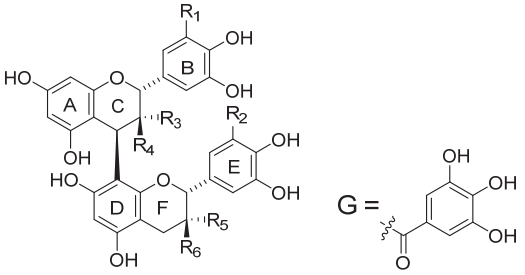
講演番号：2A16p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A16 会場

ガロカテキンユニット有するフラバン-3-オール 2 量体の構造-活性相関研究

Structure-activity relationship study of dimeric flavan-3-ols including gallocatechin-unit

○濱田 義知[1]、中島 範行[2]、齊藤 安貴子[1] ([1]大阪電通大院工、[2]富山県立大工)
○Yoshitomo HAMADA[1], Noriyuki NAKAJIMA[2], Akiko SAITO[1] ([1]OECU, [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】 プロアントシアニジン(PA)は、フラバン-3-オールが重合したオリゴマー構造を有するポリフェノールの一種であり、お茶やカカオといった嗜好品やブドウ等の果物類など、多くの植物に含まれる高機能性化合物である。PA はこれまでに、極めて強い抗酸化活性・抗腫瘍活性・抗ガン活性など、様々な生理活性を有することが報告されている。しかし、天然からは複雑な類縁体との混合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構については、今もなお解明されていない。

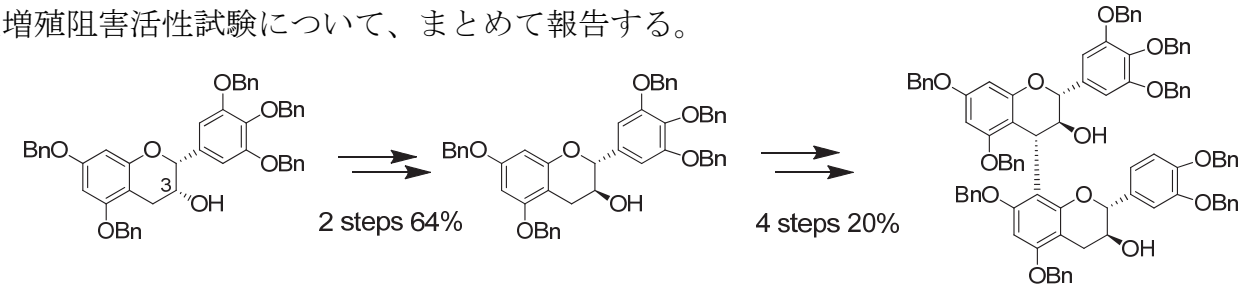


1: $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$, $R_3 = R_6 = OH$
2: $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = R_4 = R_5 = OH$
3: $R_1 = R_3 = R_6 = OH$, $R_2 = R_4 = R_5 = H$
4: $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = OH$, $R_4 = R_6 = H$
5: $R_1 = R_2 = R_3 = OH$, $R_4 = R_6 = H$, $R_5 = OG$

Figure 1. 合成した flavan-3-ol 2 量体の構造

我々はこれまでに、2 量体 **3**～**5** の化合物に強い子宮頸ガン細胞 HeLa S3 増殖阻害活性があり、その中でもフェノール性水酸基の数が少ない **3** の活性が一番強かったことを報告した(1)。この結果により、活性発現にはフラバン骨格の B 環状水酸基の数が強く影響していることが示唆された。本発表では、さらに様々な構造を持つ 2 量体を合成し、構造-活性相関研究を行ったので報告する。

【方法と結果】 市販のお茶カテキンから誘導した **6** に対し、3 位水酸基を光延反応により立体反転させた後、加水分解によりガロカテキン誘導体 **7** を合成した。この **7** を用い、フラバン-3-オール誘導体と縮合することで 2 量体 **8** を合成した。本発表では、他の立体を有する 2 量体の合成、およびそれらの細胞増殖阻害活性試験について、まとめて報告する。



6 **7** **8**

Scheme 1. ガロカテキンユニットを有する 2 量体 (**8**)の合成

(1) Y. Hamada, *et al. molecules* **20**, 18870–18885, (2015).

Proanthocyanidin, inhibitory activity against HeLa S3 cell proliferation, structure activity relationship

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2A16p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A16 会場

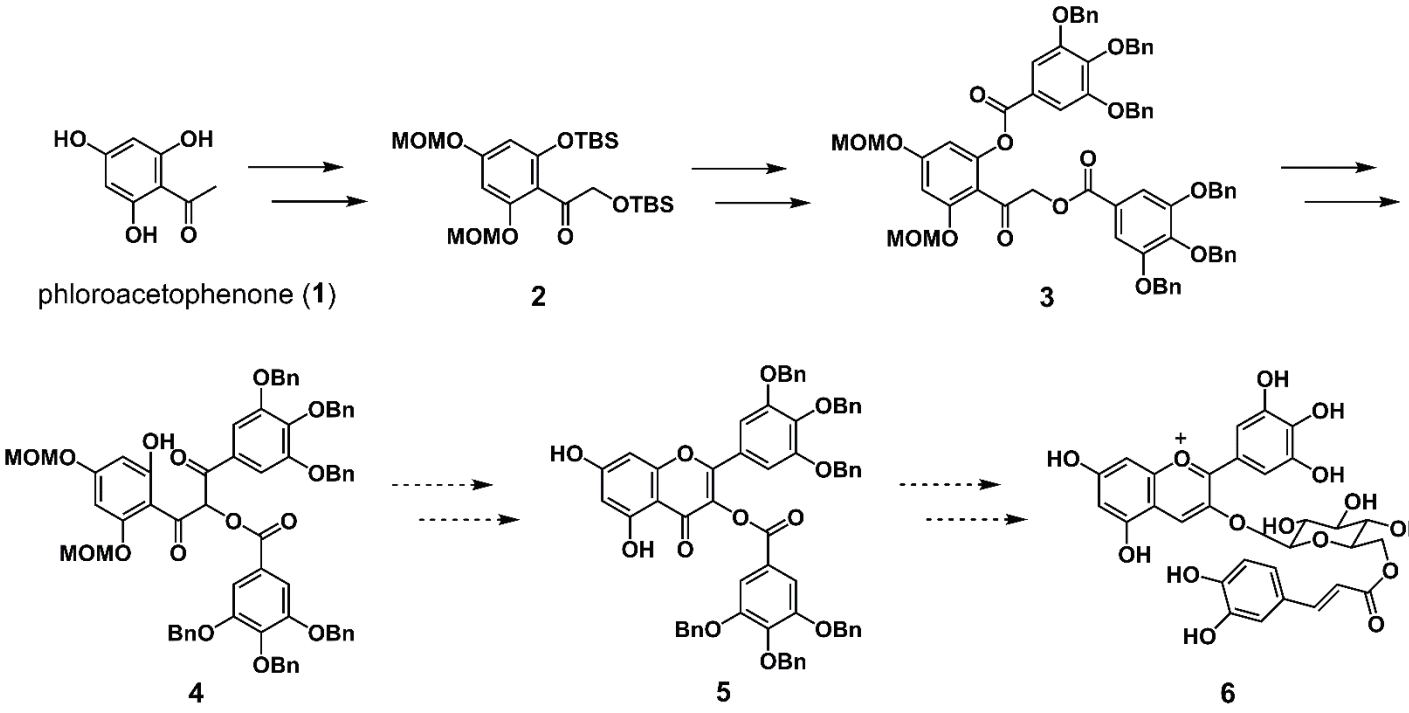
芳香族有機酸を有するアシル化アントシアニンの合成研究

Synthetic study of acylated anthocyanin containing aromatic acid

○柴 康太[1]、尾山 公一[2]、近藤 忠雄[1]、吉田 久美[1] ([1]名大院情報学、[2]名大物国セ)
○Kota Shiba[1], Kin-ichi Oyama[2], Tadao Kondo[1], Kumi Yoshida[1] ([1]Grad. Sch. Info. Nagoya Univ., [2]RCMS, Nagoya Univ.)

【目的】単純な構造のアントシアニン類は中性の希薄溶液中で不安定であるのに対し、分子内に複数個の芳香族有機酸を持つ多アシル化アントシアニンは安定である。これは芳香族有機酸が、発色団の上下からサンドイッチのように分子内会合して水和を抑えているためと考えられる [1)]。しかし、この分子会合体の精密な化学構造は明らかになっていない。我々は、この解明を目的に多アシル化アントシアニンの合成を目指している。今回、アシル化フラボノールの還元によるアシル化アントシアニンの合成研究を報告する。

【結果と方法】フロロアセトフェノン(**1**)を位置選択的に MOM 保護した後、Rubottom 酸化によりケトン体 **2** へと変換した。段階的に TBS 基を除去して、改良田辺法 [2)]を用いてエステル化することにより **3** を合成した。**3** を Baker-Venkataraman 反応により **4** へ変換した。現在 **4** から **5** への環化を検討中である。今後、配糖化とアシル化を経て **6** を合成する予定である。



1) Yoshida, K., et al., *Nat. Prod. Rep*., **2009**, 26, 857-964. 2) Oyama, K., et al., *Tetrahedron,* **2015**, 71, 3120-3130.

synthesis of acylated anthocyanin, delphinidin, Rubottom oxidation

講演番号：2A16p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A16 会場

アントシアニン類の活性酸素種消去 メカニズムに関する研究
Oxidative Degradation Mechanism of Anthocyanin
○佐竹 竜弥、柳瀬 笑子 (岐阜大)
○Ryuya SATAKE, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

ポリフェノールの 1 種であるアントシアニン類は、赤色から紫色を呈する色素成分として果物や花など植物界に広く分布し、食品中にも多く含まれる。アントシアニンは 3 つの 6 員環(A 環、B 環、C 環)からなる化合物であり、C 環酸素原子上にカチオンを持つという特徴を持つ。他のポリフェノールと同様に様々な機能性が知られており、特に強い抗酸化性を示すことが知られている。先行研究において、ラジカル重合開始剤として知られる 2,2'-Azobis(2,4-dimethyl valeronitrite)(AMVN)を利用したアントシアニンのラジカル酸化を行ったところ、反応溶媒によってラジカル補足生成物がまったく異なることを見出し、その生成物の構造及び推定反応機構を報告してきた。

本研究ではアントシアニン類の抗酸化メカニズムに対するラジカル種の違いによる影響を明らかにする目的で、アントシアニン及びカテキン類の酸化反応を、生体内のおいても見られる活性酸素種として、Fenton 反応によるヒドロキシラジカルと過酸化水素を用いて行った。さらに、生成物の構造決定を行い、その推定反応機構について考察したので報告する。

Cyanidin *3-O*-glucoside(**1**)を過酸化水素によって酸化したところ、B 環由来の Protocatechuic acid やそのエチルエステル、C 環が開裂または 5 員環へと縮環した化合物が得られた。またこれらの酸化物の収率及び生成比が使用する反応溶媒によって変化することが明らかとなった。さらに、^{18}O ラベル化した H_2O 及び H_2O_2 を用いて反応を行い、MS、MS/MS 解析を行うことによりアントシアニンの過酸化水素捕捉機構の解明を行った。

アントシアニン類の構造的特徴と酸化反応における反応性の関係を明らかにするために、類似構造を持つ (-)-Epicatechin（**2**）及び Quercetin（**3**）についても同条件で反応を行った。アントシアニン類と比較しこれらの化合物と過酸化水素との反応速度はかなり遅く、反応開始 4 時間で **1** が約 80% 減少したのに対し、ほとんど減少しなかった。各種条件検討を行うことによって **2** や **3** の過酸化水素による酸化物の生成が確認され、**2** と過酸化水素の反応においては、A 環が酸化的に開裂した構造であることが、**3** においては **1** と同様に C 環が開裂した構造であることが明らかとなった。分解生成物の構造の違いから、アントシアニン類とカテキン類では反応性の高い部位が異なることが明らかとなり、C 環部の酸化段階の違いによって酸化機構が異なることが示唆された。

anthocyanin, degradation, hydrogen peroxide

発表責任者：柳瀬笑子（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A16p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A16 会場

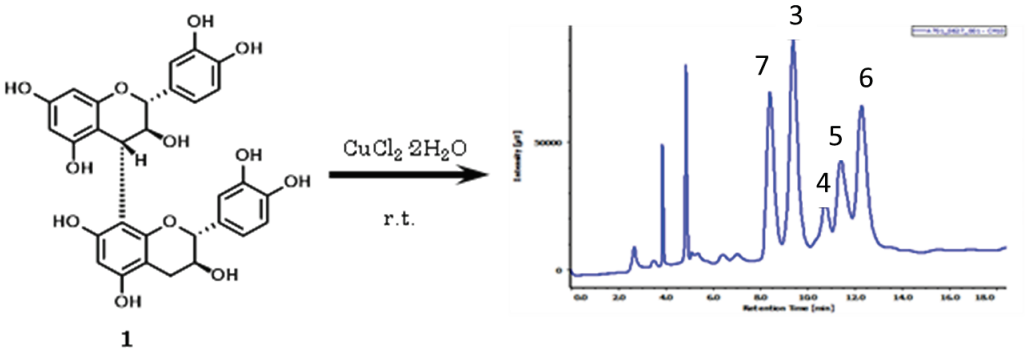
赤米色素ポリフェノールの貯蔵中における化学変化に関する研究

Study on the chemical change of the red rice polyphenol during storage

○日比 啓秀、柳瀬 笑子（岐阜大応生）
○Yoshihide HIBI, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】赤米とは古代米の一種であり，種皮または果皮にプロシアニジンというタンニン系の赤色色素を含む品種である。プロシアニジンはカテキンが連なった高分子化合物であり，抗酸化，抗がんなどさまざまな生理活性があると報告されている。赤米は収穫後，貯蔵期間中に赤みを増すという濃色化現象が知られている。赤米中の成分の時間経過による変化を調査したところ、濃色化現象は空気酸化によるプロシアニジン類の化学的変化に起因することが示唆された。そこで本研究では、濃色化における化学変化を詳細に解析するために，モデル化合物として(+)-カテキン 2 量体(1)，3 量体(2)を合成し酸化反応を行った。

【方法と結果】モデル化合物であるカテキン 2 量体(1)及び 3 量体(2)は (+)-タキシフォリンと(+)-カテキンから合成した。酸化剤として塩化銅二水和物を用いて 1 を酸化し，HPLC により反応追跡を行った。その結果，新しく 5 つのピークが検出された。そのうち 4 つについて各種機器分析により，新たに分子内結合が形成された新規(+)-カテキン 2 量体酸化物として構造決定した。また，3-6 は互いに平衡関係にある立体異性体であり，それらの生成機構を推定した。次に 2 を同条件下で酸化し，反応液の HPLC 分析を行った。その結果，新しく複数のピークが検出され，現在それらを各種機器分析に供し構造決定を行っている。赤米ぬか抽出物及び残渣中のプロシアニジン類の 2 - メルカプトエタノールを用いた分解反応を行い，その反応物の LC-MS/MS 分析を行った。その結果，2 量体酸化物として構造決定した化合物 3-6 及びその関連化合物と推定されるピークが検出された。以上のことから濃色化現象は，プロシアニジンの分子内結合が新たに形成されることで進行することが示唆された。



1

図　(+)-カテキン2量体の酸化反応

procyanidin, catechin, oxidation

講演番号：2A16p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A16 会場

Epigallocatechin oligomer の合成と抗腫瘍活性評価

Synthesis of Epigallocatechin oligomer and its antitumor activity

○山本 慎也[1]、市川 幹広[1]、石原 知里[5]、野々部 修平[3]、梅澤 公二[2,5]、服部 恭尚[4]、藤井 博[2,5]、真壁 秀文[1,2] ([1]信州大院総合理工農、[2]信州大バイオメディカル研究所、[3]信州大農、[4]京都薬科大共同利用機器、[5]信州大院総合理工生命医工)

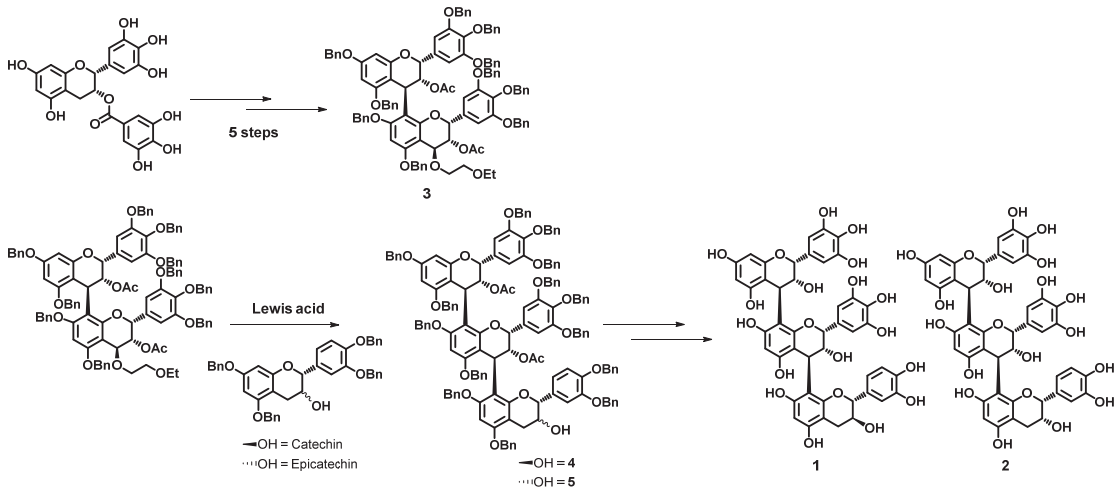
○Shinya Yamamoto[1], Mikihiro Ichikawa[1], Chisato Ishihara[5], Shuhei Nonobe[3], Kouzi Umezawa[2,5], Yasunao Hattori[4], Hiroshi Fujii[2,5], Hidefumi makabe[1,2] ([1]Shinsyu Univ Graduate School Department of Agriculture, [2]Shinsyu Univ Department of Biomedical, [3]Shinsyu Univ Department of Agriculture, [4]Centre for Indtrumental Analysis, Kyoto Pharmaceutical Univ, [5]Shinsyu Univ Graduate School Department of Biomedical Engineering)

【背景】

Proanthocyanidin は縮合型タンニンの一種であり，抗酸化活性をはじめとする様々な生理活性を有することが知られている．しかし天然には縮合度の多様さや結合様式の違いによって多数の構造類似体が存在することから単一成分を分離することは難しく，単一成分の生理活性には未知な部分が多い．そこで当研究室では有機合成の手法により様々な proanthocyanidin を選択的かつ単一に合成しその生理活性を調べてきた．そして先行研究より epigallocatechin oligomer は類似体に比べ高い抗腫瘍活性を有することが分かった．それを踏まえ本研究では新たに設計した非天然型 epigallocatechin 三量体の誘導体の合成と抗腫瘍活性発現への影響を調べたためここに報告する．

【実験と結果】

市販品である epigallocatechin gallate を出発物として 5 ステップで二量体求電子剤 **3** を合成し，epicatechin, catechin と Lewis 酸を用いた縮合反応によって三量体中間体 **4**, **5** を得た．続く脱保護により目的の化合物 **1**, **2** を 8 段階，全収率約 10%で合成した．得られた化合物の抗腫瘍活性を調べたところ epigallocatechin 三量体でみられた抗腫瘍活性が消失したことから，epigallocatechin 三量体の抗腫瘍活性の発現は末端ユニットのピロガロール基の有無と相関が示された．今後はより高重合 epigallocatechin oligomer の合成による重合度と抗腫瘍活性の相関の解明や proanthocyanidin 分子プローブの合成とそれを用いた細胞内動態の観察，作用タンパクの同定を試みる予定である．



total synthesis, proanthocyanidin, antitumor

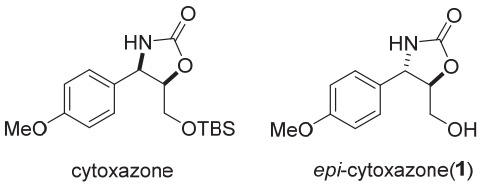
講演番号：2A16p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A16 会場

ビス-トリクロロアセトイミダートの分子内環化を用いた *epi*-サイトキサゾン **1** の効率的合成

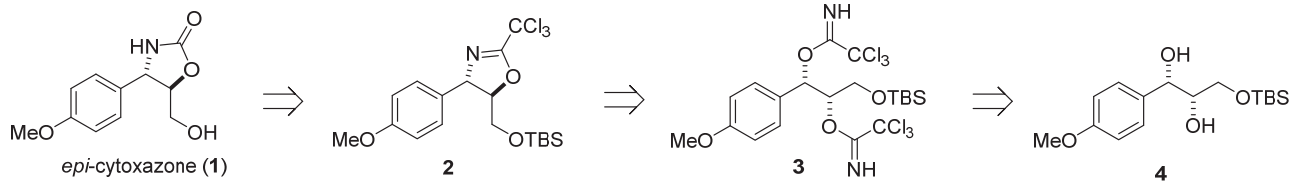
Short synthesis of *epi*-cytoxazone using intramolecular cyclization of a bis-trichloroacetimidate

○石川 萌、柴崎 里菜、野島 結貴、松島 芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）
○Moe ISHIKAWA, Rina SHIBASAKI, Yuki NOJIMA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Applied Biology and Chemistry)

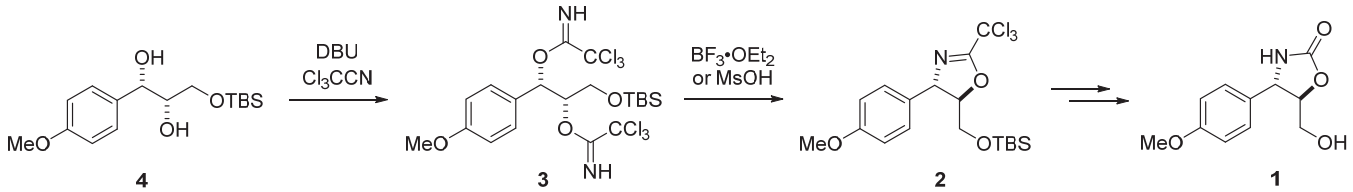
【背景・目的】サイトキサゾンは、1998 年に理研の長田らにより放線菌からサイトカイン調節因子として単離・構造決定された生物活性物質である [1]。本研究ではトリクロロアセトイミダートを用いた窒素官能基の導入を鍵反応とし、*epi*-サイトキサゾン **1** の新規で効率的な合成を行うことを目的とする。



【方法・結果】*epi*-サイトキサゾン **1** の逆合成解析を下記に示した。**1** のトランス置換 **2**-オキサゾリジノン環は、対応するオキサゾリン化合物 **2** より導くことができると考えた。オキサゾリン **2** の合成には、本合成研究の鍵反応として開発するビス-トリクロロアセトイミダート **3** の分子内環化反応を用いることとした。ビス-イミダート **3** は文献既知の光学活性ジオール **4** [2]より容易に調製可能と考えた。



光学活性ジオール **4** を出発物質としてビス-イミダート **3** を得た。**3** の分子内環化について、ルイス酸やプロトン酸などを用いて検討を行ったところ、分子内反応が進行していることがわかった。また、その立体化学については期待した通りトランス置換のオキサゾリン **2** であり、その後の変換によって効率よく目的の *epi*-サイトキサゾン **1** を合成することに成功した。反応の詳細について報告する。



1) H. Kakeya, M. Morishita, K. Kobinata, M. Osono, M. Ishizuka, H. Osada *J. Antibiot*, **1998**, *51*, 1126-1128.
2) M. Seki, K. Mori *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2965-2967.

Trichloroacetimidate, *epi*-cytoxazone, Intramolecular cyclization

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：2A16p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A16 会場

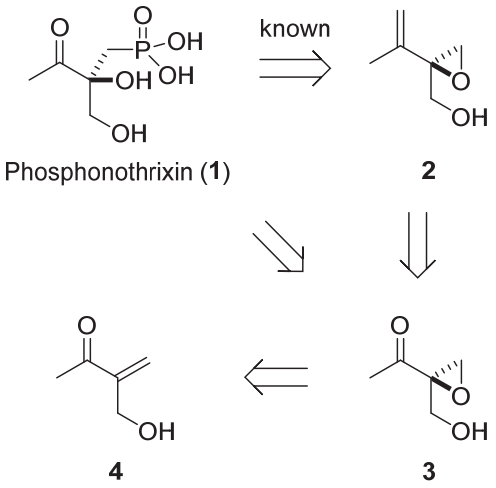
除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの合成研究

Synthetic studies of phosphonothrixin, a herbicidal antibiotic

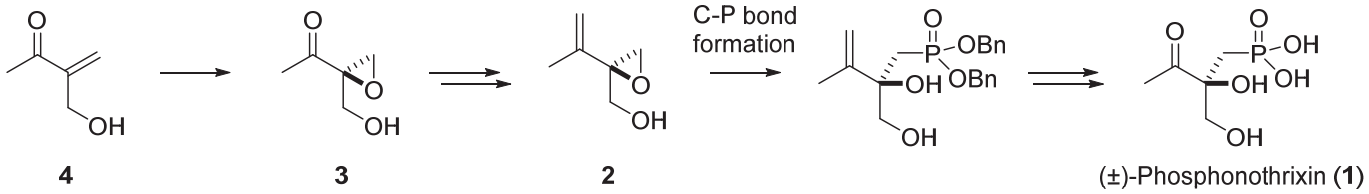
○中村 皓毅、近藤 弘史、寺澤 慶彦、松島 芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）
○ Kouki NAKAMURA, Hiroshi KONDO, Yoshihiko TERASAWA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Applied Biology and Chemistry)

【方法・結果】ホスホノトリキシン **1** は、*Saccharothrix sp.* ST-888 から単離された除草活性を有する抗生物質である [1)]。現在までにいくつかの合成が報告されているが、報告されている光学活性体合成の出発物質は調製が容易ではなく、再現性に乏しいため効率的な合成とはいえない [2)]。本研究では **1** の効率の良い合成経路の確立を目的とする。

【方法・結果】ホスホノトリキシン **1** の逆合成解析を示した。**1** は化合物 **2** に対する C-P 結合形成反応による合成が報告されている。化合物 **2** は、容易に調製可能な化合物 **4** を出発原料として、化合物 **3** を経て効率的に入手できると考えた。化合物 **3** はラセミ体が文献既知であり、化合物 **4** より光学活性体として両鏡像体が入手可能と考えられるため、本合成計画は光学活性体の合成にも適用可能なものである。また、より簡便に化合物 **2** を経ないで化合物 **3** から **1** を合成する経路についても検討する。



まずラセミ体合成について検討した。Baylis-Hillman 反応によって得られるアリールアルコール **4** をエポキシ化して文献既知のラセミ体 **3** を得た。その後、Wittig 反応を含む三工程で化合物 **2** に変換した。その後は C-P 結合形成反応などを行い、ホスホノトリキシン **1** のラセミ体合成に成功した。詳細について報告する。



1) K. Nakamura, T. Kimura, E. Takahashi, M. Arahira, M. Iida, *J. Antibot.* **1995**, *48*, 1124-1129; 1130-1133.
2) K. Nakamura, S. Yamamura, *Tetrahedron Letters,* **1997**, *38*, 437-438.

phosphonothrixin, herbicidal antibiotic, C-P bond formation

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：2A16p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A16 会場

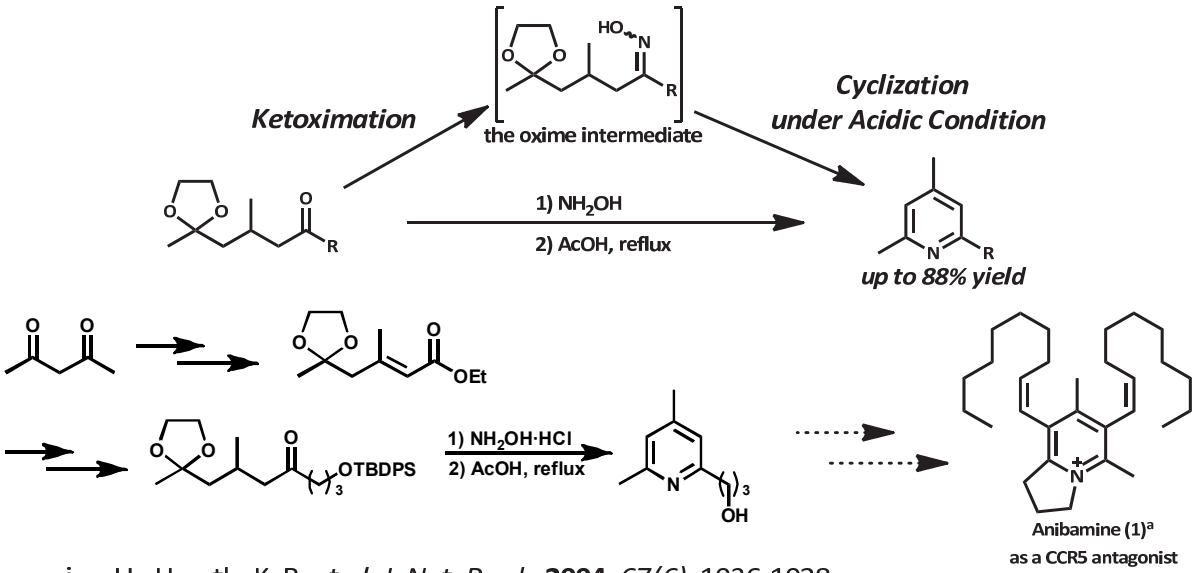
オキシム中間体を経由したピリジン合成法の開発： Anibamine の合成研究

Metal-free Pyridine Synthesis via Oxime Intermediate: Synthetic Study of Anibamine

○宮腰 建、今野 博行（山形大院理工）
○Takeru MIYAKOSHI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

【背景・目的】ピリジン環は天然物にしばしば含まれる重要な複素環式骨格である。現在、その用途は有機機能材料や触媒、医農薬品などへ拡大されている。しかしながら、現在ピリジン合成は金属触媒反応が主流であり、メタルフリーの条件では、嵩高い官能基を持ち基質自体が硬直なものに限られている。そこで今回、より単純な基質を用いたメタルフリーピリジン合成法の開発を検討した。さらに、本反応を 6 置換ピリジンである Anibamine（**1**）の合成への適用を試みた。

【方法・結果】メタルフリーピリジン合成としてヒドロキシルアミンを用いる反応を検討することにした。この反応は古典的な方法でありこの方法も嵩高い官能基と硬直な構造をもつ基質を用いた報告がほとんどであった。そこで単純な基質でヒドロキシルアミン条件下の反応を行った所分子内アルドール反応が優先し望むピリジン骨格はほとんど得られなかった。これは基質の制限の大きさを物語っている。この反応を抑制するため反応条件のスクリーニングを行った。その結果、オキシム中間体の形成確認後、酢酸溶媒中加熱還流することでピリジンが構築できることを見出した。更に、一つのカルボニルをケタールで保護した基質で反応させた所収率の改善が見られた。2,6 位にアルキル基を有するピリジン環構築はその合成例が少なく有用性が期待できる。そこで本方法を鍵反応として六置換ピリジンをもつ Anibamine（**1**）の合成に着手した。現在全合成にむけた条件検討を行っている。



a) Jayasuriya, H.; Herath, K. B. *et al. J. Nat. Prod.*, **2004**, *67(6),* 1036-1038.

oxime intermediate, metal-free pyridine synthesis, Anibamine

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2A16p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A16 会場

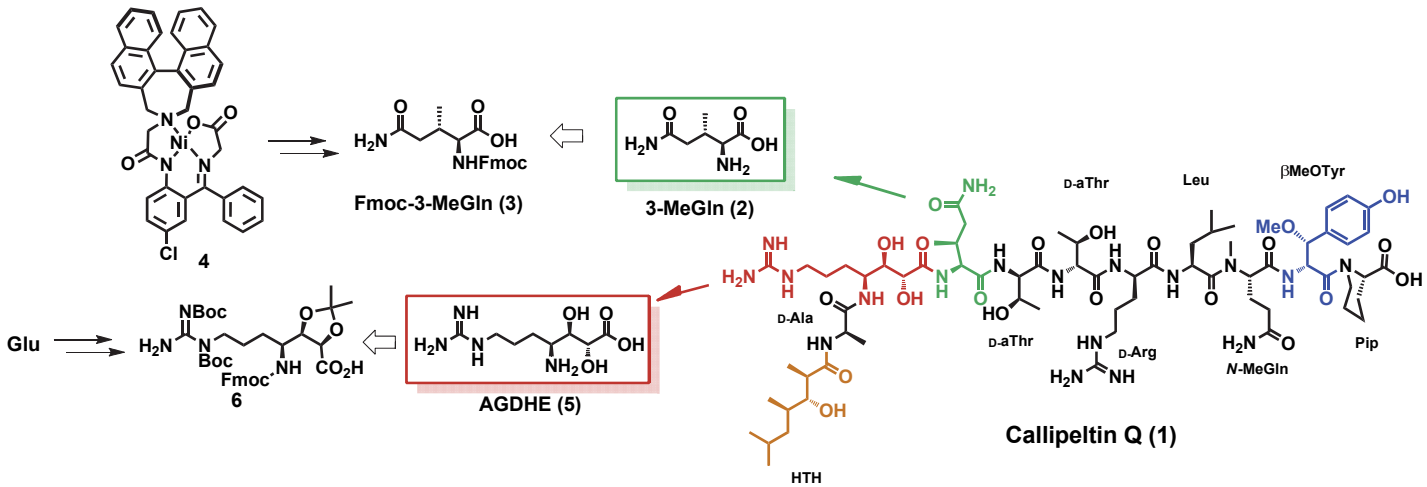
Callipeltin Q の合成研究

Synthetic study of Callipeltin Q

○東海林 由憲、今野 博行（山形大院理工）
○Yoshinori TOKAIRIN, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

海綿より単離される環状デプシペプチド類は強力な抗癌作用や抗ウイルス作用があるものが知られており、大変魅力的な天然物群である。代表的な化合物類に Callipeltin や Neamphamide、Homophymine、Papuamide などがあげられ、それぞれ多くの異常アミノ酸を含んでいる。現在までにこれら天然物の全合成がいくつか報告されているが、活性部位の解明には至っていない。そこで当研究室では構造活性 相関研究に向けた全合成に取り組んできた。本発表では Callipeltin Q (1)の全合成について報告する。 全合成にあたり、誘導体合成に優位な Fmoc 固相合成法を基本戦略として用いることとした。そのため、まずはじめに Callipeltin Q (1)を構成する異常アミノ酸の Fmoc 誘導体の合成を行った。3-Methylglutamine (3-MeGln, 2) は Soloshonok と浜理薬品によって開発されたグリシンリガンド(4) を用いクロトン酸にマイケル付加させることで立体選択的に3を合成した。4-Amino-7-guanidino-2,3-dihydroxyheptanoic acid (AGDHE, 5) は Glu を出発原料とし Z 選択的なホーナエモンズ反応、続くOsO_4を用いたジヒドロキシル化、光延反応条件下によるグアニジル基導入を鍵反応とし6を調製した。

次に2-クロロトリチル樹脂を用いた Fmoc 法により PyBOP/HOBt をカップリング剤として C 末端から順に縮合し、樹脂から切り出すことで保護 Callipeltin Q (1)を得た。最後に50% TFA/CH_2Cl_2で処理することで側鎖保護基を脱保護しCallipeltin Q (1)を微量ながら得ることに成功した。現在、さらなる効率化を目指し、縮合・脱保護 条件を検討している。



Callipeltin, unusual amino acid, solid phase peptide synthesis

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2A16p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A16 会場

Lantibiotic peptide SapB の固相全合成研究

Synthetic Study of SapB, Lantibiotic peptide

似内 郁美、○今野 博行（山形大院理工）
Ikumi NITANAI, ○Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

[[目的]

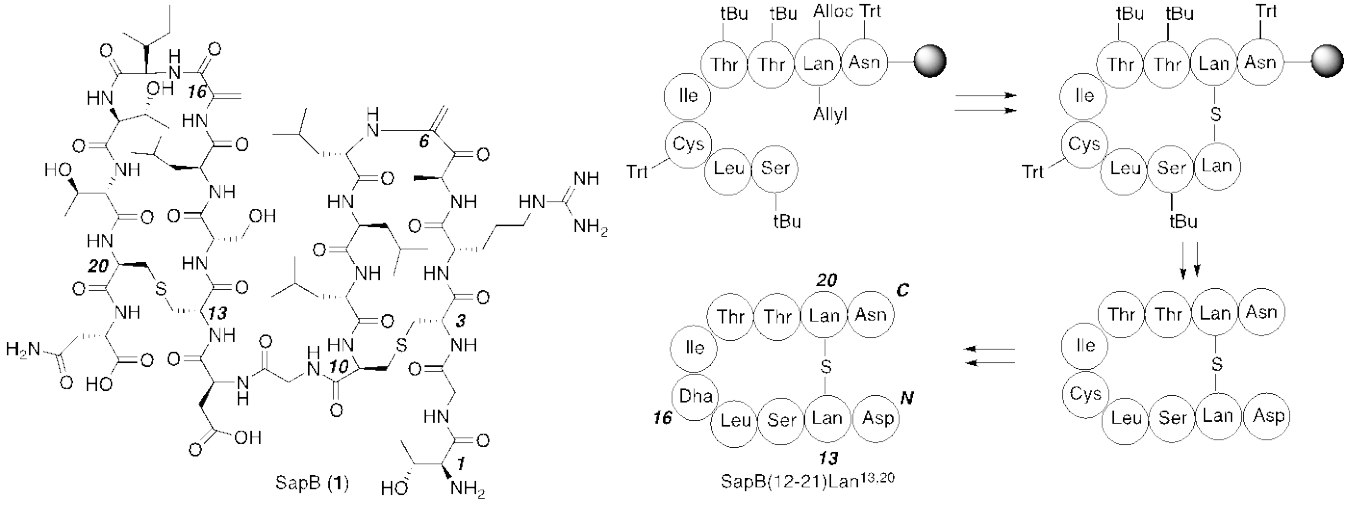
Lantibiotic peptide はランチオニン (Lan) 架橋構造を有するリボソーム系環状ペプチドであり、既存の抗生物質とは異なる新しい作用機序や抗菌活性が注目されている。SapB (**1**) は 2004 年小谷らによって単離、構造決定された 2 環性 lantibiotic peptide であり、Lan 架橋とデヒドロアラニン (Dha) をそれぞれ 2 つもつ特徴的な構造を有する[1]。我々はこの特異な構造に興味を持ち、lantibiotic peptide の効率的な合成法の開拓を目的に研究を行っている。

[方法と結果]

母核の合成は Lan 架橋部位として Ser と Cys から合成した Lan ビルディングブロックと保護アミノ酸を用意し、Fmoc-固相合成法で行うことにした。また、Dha は前駆体を Cys とし、合成の終盤で脱硫反応を用いることで導くことにした。

まず Lan 架橋部位は Patrick らの方法に従い、Ser と Cys から 9 工程を経て Fmoc-Lan(Alloc, Allyl)-OH として合成した。次に各カップリング反応と脱硫反応の検討を行う目的で 2 つの環状構造、すなわち SapB(1-11)Lan^{3,10} と SapB(12-21)Lan^{13,20} の保護体をそれぞれ Fmoc-固相合成法により合成した。環状部の構築は固相上で Alloc, Allyl 基の脱保護とマクロラクタム化によって行えることがわかった。これらの結果について詳細を報告する。

1) Kodani, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11448-11453.



Lantibiotic peptide, dehydroalanine, solid phase peptide synthesis

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2A16p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A16 会場

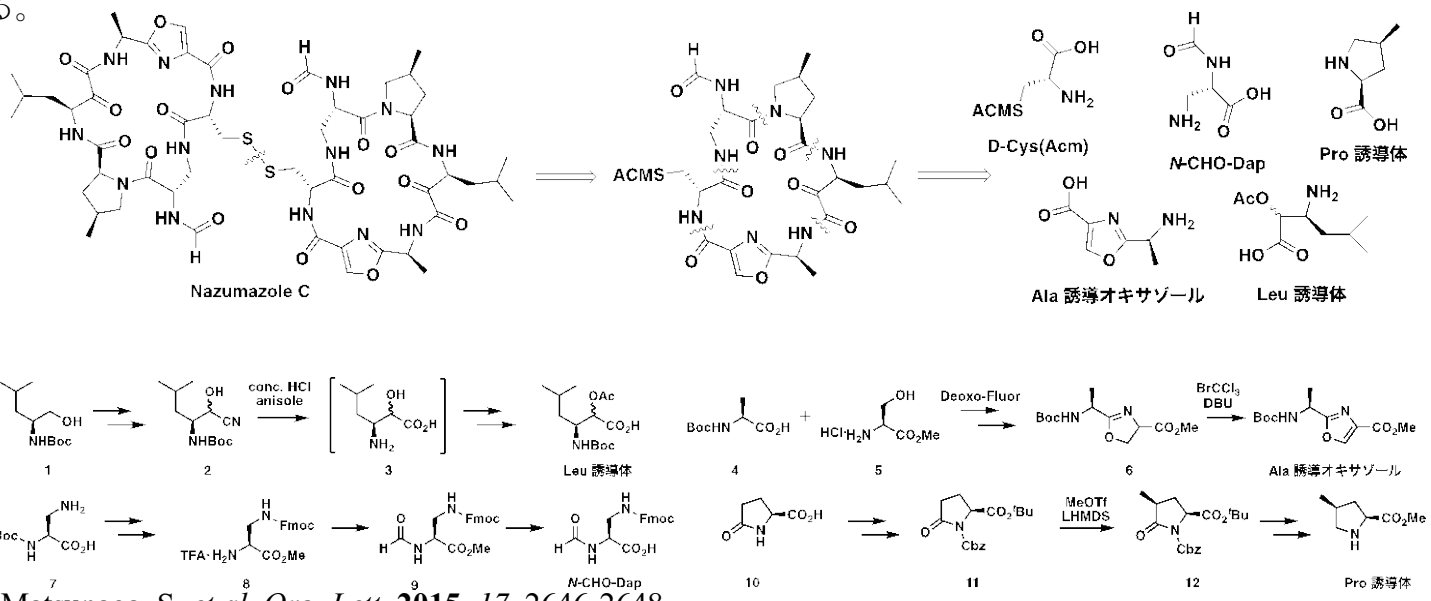
海綿動物由来環状ペプチド Nazumazole C の構成フラグメント合成

Synthesis of Amino Acid Fragments of Nazumazole C from a Marine Sponge

○川島 麻友美、田中 悠太郎、鷹觜 千佳、石原 稿太朗、松儀 真人、塩入 孝之（名城大農）
○Mayumi KAWASHIMA, Yutaro TANAKA, Chika TAKANOHASHI, Kotaro ISHIHARA, Masato MATSUGI, Takayuki SHIOIRI (Meijo Univ.)

【目的】Nazumazole 類は海綿動物 *Theonella swinhoei* から単離・構造決定された化合物群であり、環状ペンタペプチドがジスルフィド結合を介して二量体化した特異な構造をしており、マウス白血病細胞 P388 に対して細胞毒性を有している。Nazumazole 類の化学合成は未だ達成されておらず、その詳細な生物活性は明らかにされていない。そこで本研究では Nazumazole C の全合成を目的として各フラグメントを合成した。

【方法・結果】Nazumazole C を逆合成により Leu 誘導体、*N*-CHO-Dap、Ala 誘導オキサゾール、D-Cys(Acm)、Pro 誘導体の 5 つのフラグメントに分けた。Leu 誘導体は Leucinol **1** を出発物質として Cyanohydrin **2** へと誘導し、シアノ基を加水分解して再び Boc 保護することで合成した。Ala 誘導オキサゾールは Boc-L-Ala-OH **3** と H-L-Ser-OMe 塩酸塩 **4** を縮合し、Deoxo-Fluor を用いて oxazoline **6** を合成した後、オキサゾールへと誘導した。*N*-CHO-Dap は Boc-L-Dap **7** を原料に脱 Boc 体 **8** をホルミル化し、得られた **9** を加水分解することで合成した。Pro 誘導体は、L-Pyroglutamic acid **10** を Cbz, ^{t}Bu エステルで保護して **11** を得たのち、MeOTf を用いてメチル化体 **12** へと変換し、これを還元することで合成した。今後、5 つのフラグメントを縮合・環化させて二量化させることで全合成を達成する。



* Matsunaga, S. *et al. Org. Lett.* **2015**, *17*, 2646-2648.

Nazumazole C, total synthesis, cyclic peptide

講演番号：2A16p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A16 会場

ヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチドの構造活性相関に向けた類縁体合成

Chemical synthesis of starfish relaxin-like gonad-stimulating peptide derivatives

○片山 秀和[1]、中村 啓太郎[1]、三田 雅敏[2] ([1]東海大工・生命化学、[2]東京学芸大教育・生物)
○ Hidekazu KATAYAMA[1], Keitaro NAKAMURA[1], Masatoshi MITA[2] ([1]Tokai Univ., [2]Tokyo Gakugei Univ.)

【背景・目的】
棘皮動物の一種であるヒトデの雌の性成熟は、放射神経より分泌されるリラキシン様生殖腺刺激ペプチド（RGP）によって促進される。RGP は、A 鎖および B 鎖からなるヘテロ二量体構造を有するペプチドホルモンである。これまでに 11 種のヒトデから、RGP 前駆体をコードする cDNA がクローニングされているが、それらのアミノ酸配列はイトマキヒトデ、マヒトデ、およびエゾヒトデの 3 種類の RGP のいずれかと同一である。しかし、RGP によるヒトデの分類と動物分類学上のヒトデの分類が一致していない点もあり、RGP および RGP 受容体の分子進化に興味が持たれる。そこで本研究では、その一端を明らかにすることを最終的な目的とし、まず RGP の構造と機能との関係を明らかにするために、3 種類の RGP の A-B 鎖を様々に組み合わせた種々の RGP 類縁体を化学合成することにした。
【方法・結果】
各 3 種類の A 鎖および B 鎖を、常法による Fmoc ペプチド固相合成法によってそれぞれ調製した。その際、位置選択的なジスルフィド結合形成反応を可能とするために、側鎖を trityl 基、*p*-methoxybenzyl 基および acetamidomethyl 基で保護した Cys 誘導体を用いた。得られた A 鎖および B 鎖の Cys 残基側鎖保護基の脱保護と酸化を順次行うことによってジスルフィド結合を選択的に形成し、3 種類の RGP および 6 種類のキメラペプチドを得た。今後、CD スペクトルによるフォールディングの確認、および生物検定による活性評価を行っていく予定である。

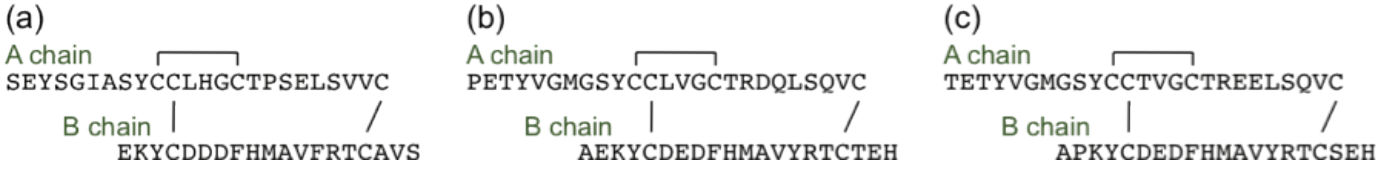


図. RGP の構造. (a) イトマキヒトデRGP; (b) マヒトデRGP; (c) エゾヒトデRGP.

relaxin-like gonad-stimulating peptide, starfish, structure-activity relationship

発表責任者：片山　秀和（katay@tokai-u.jp）

講演番号：2A16p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A16 会場

皮膚バリアの重要分子、不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成

Synthesis of acylceramides including unsaturated ultra-longchain fatty acids that are crucially important to skin barrier

○村井 勇太[1]、小川 連[2]、端野 翔太[2]、門出 健次[1] ([1]北大先端生命、[2]北大生命科学院)
○Yuta MURAI[1], Ren OGAWA[2], Shota HASHINO[2], Kenji MONDE[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ)

研究目的

全国には 40 万人を超えるアトピー性皮膚炎の患者が存在し、その治療薬の社会的ニーズは極めて大きい。しかし，現在のアトピー性皮膚炎の治療は免疫系を抑える対症療法でしかなく，症状の原因を取り除くことができない。ヒトを含めた陸上生物の体表面を形成する皮膚はバリア機能により保護され、感染症、アレルギー疾患の原因となる病原体や異物の侵入を防いでいる。皮膚バリア機能の本体は脂質であるが、皮膚にはバリア機能に特化した超長鎖脂肪酸と呼ばれる炭素鎖 28 以上の脂肪酸とそのω位水酸基にリノール酸がエステル結合した分子量 1500 前後という巨大中分子であるアシルセラミドが存在する。アシルセラミドは、脂質全体の 5～8%程度の量しか存在しないにも関わらず、その低下は重篤な皮膚病を引き起こす。[1)] また、ごく最近、皮膚バリア形成不全型ケラチノサイトに、アシルセラミド添加により、皮膚バリア形成関連遺伝子の活性化の報告[2)]もされることから極めて重要なアシルセラミドではあるが、以下の点が未だ未解明のままである。

・ 表皮中での物理的性質（数%の存在割合で皮膚バリア・ラメラ構造を維持できる仕組み）
・ アシルセラミドが治療薬としてのポテンシャルを持つのか？また分子種による効果の違いは？

実際、アシルセラミドの合成例は数例[3)]しかなく、標準サンプルの供給としては充分ではない。また、健常な個体からの単離はその微量性のため困難であり、また他の脂質群が混在する可能性も高い。そこで本研究では、これらアシルセラミドの化学的全合成を実施、グラムスケールの供給を目指した。

研究内容

皮膚バリア中、最も多く存在するアシルセラミド分子種は C34:1 の超長鎖脂肪酸を持つものである。また最も長いもので C36:1 が確認されており、これらアシルセラミド群の合成例はない。当初、アルキン-アルキルハロゲンのカップリングによって鎖長増炭反応を行ってきたが、鎖長が C20 以上になると反応性の乏しさから 10～20%程度の収率しか得られなかった。そこで、Wittig 反応を鍵とし、鎖長増炭反応を行うことで、効率よく超長鎖脂肪酸を合成することに成功した。これにより、C34:1 または C36:1 の超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成にも成功したので報告する。

1) Kihara, A. et al., *Prog. Lipid Res.* **2016**, *63*, 50. 2) Hirabayashi, T. et al., *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14609. 3) Tashiro, A.et al., Biosci. Biotechnol. Viochem. **2012**, *76*, 1715. Opalka, L., et al., Org. Lett. **2015**, *17*, 5456.

acylceramides, ultra-long-chain fatty acids, skin barrier

講演番号：2A16p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A16 会場

p-トルオイル基を利用した 3-デオキシ-ソホロース誘導体の効率的合成

Efficient synthesis of 3-deoxy-sophorose derivatives using *p*-toluoyl group.

○田中 信清[1,2]、中島 将博[1]、今場 司朗[2]（[1]東理大院理工、[2]農研機構）
○NOBUKIYO TANAKA[1,2], MASAHIRO NAKAJIMA[1], SHIRO KOMBA[2] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]NARO)

【目的】β-1,2-グルカンはグルコースがβ-1,2-結合により連なった多糖であり、微生物の分泌する環状糖としての存在が主に知られ、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要とされている。しかし、β-1,2-グルカン分解酵素の報告例はきわめて少ない。私たちは、これまでに糸状菌 *Talaromyces funiculosus* よりβ-1,2-グルカナーゼ(*Tf*SGL)を単離同定し、これが新規糖質加水分解酵素ファミリーとなり得る新規配列を有し、アノマー反転型酵素であることを明らかにした。またβ-1,2-結合の 2 糖であるソホロース(Sop_2)と触媒残基変異体との複合体構造取得にも成功している。本酵素の基質ポケットでは基質切断部位の酸素原子への直接のプロトン供与が可能な位置には基質のサブサイト+1 や+2 の 3 位 OH 基のみが存在しており、この OH 基にはそれぞれ酸性アミノ酸残基が水素結合していた。本発表では、その反応機構を解明するために利用できる 3 位 OH 基を還元した 3 種の 3-デオキシ Sop_2 誘導体の調製を報告する。
【方法・結果】グルコースを出発物質に用い、3 位 OH 基の保護基及び脱離基として *p*-トルオイル基を利用することによって、各グルコースユニットの片方または両方の 3 位 OH 基を還元した 3 種の 3-デオキシ-Sop_2 誘導体をより少ないステップで効率的に化学合成する事に成功した。興味深いことに、調製した 3 種の誘導体に対し NMR 解析を行ったところ、還元末端の 3 位 OH 基が還元された誘導体 2 種(Glcβ-(1→2)-3-deoxy-Glc, 3-deoxy-Glcβ-(1→2)-3-deoxy-Glc)において、還元末端側のグルコースユニットがピラノース及びフラノース構造をとった化合物由来のピークが確認された。また、この 2 種の誘導体に対し様々な温度中で NMR 解析を行ったところ、各構造由来のピーク面積は温度依存的に増減していることが判明した。ゆえに、還元末端の 3 位 OH 基が還元された Sop_2 誘導体では、還元末端側のグルコースユニットがピラノース構造とフラノース構造の間で平衡状態をとっていることが判明し、グルコースユニットの 3 位水酸基がピラノース構造の安定化に寄与している可能性が示唆された。

Sophorose, *p*-Toluoyl group, Deoxygenation

講演番号：2A16p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A16 会場

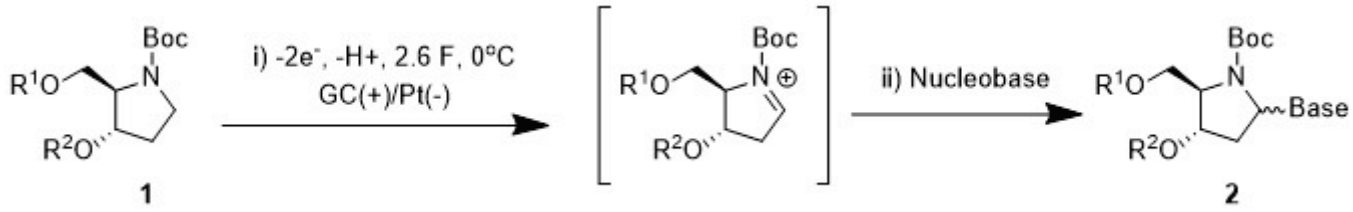
アザヌクレオシドの立体選択的合成
Stereoselective Synthesis of Azanucleoside

○石井 聖華、岡本 一央、千葉 一裕（東農工大）
○Seika ISHII, Kazuhiro OKAMOTO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】近年，核酸医薬品は，従来の低分子医薬品と比較して標的分子の多様さ，副作用の少なさなどから新たな創薬シーズとして注目を集めている．特に，糖部フラノース骨格の酸素原子を窒素原子に置換した 4'-*N*-azanucleoside は，抗ウイルス活性やオリゴヌクレオチド中における高いヌクレアーゼ耐性を示すことから，核酸医薬品への応用が期待されるヌクレオシドアナログである．

最近，我々は電気化学的手法を用いた 4'-*N*-azanucleoside の高効率合成法を報告した[(1)]．しかし，この系においては陽極酸化によって生じたイミニウムカチオン中間体の N-α 位に対して，求核剤として用いる核塩基が両面から求核攻撃し，α, β-anomer をほぼ等量生じる．通常，天然型の核酸は β-anomer のみで構成されるため，核酸医薬品の基本的な創薬アプローチとしても立体選択的合成を達成することは極めて重要である．そこで本研究においては，3' 位に導入した置換基が N-α 位に対して配位することで α 面からの求核攻撃を立体障害により抑制することを期待し，2-deoxy-4'-*N*-azanucleoside の β-anomer 選択的合成を目指した．

【方法・結果】*trans*-3-Hydroxy-L-proline を出発物として，3' 位に各種の隣接基を有する prolinol 誘導体 (**1**) を得た．続いて (**1**) を 1.0 M 過塩素酸リチウム–ニトロエタン，50 mM 酢酸混合溶媒中で陽極酸化に供し，種々の保護基 (R^2) を用いて検討を行った。その結果、R^2 が Ms 基の場合に核塩基の導入における立体選択性が見られ、一連の電解反応における有用性が示唆された。



【参考文献】

1. Shoji, T.; Kim, S.; Chiba, K., *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2017**, *56*, 4011-4014.

Electrochemistry, Stereoselective synthesis, Nucleoside analogues

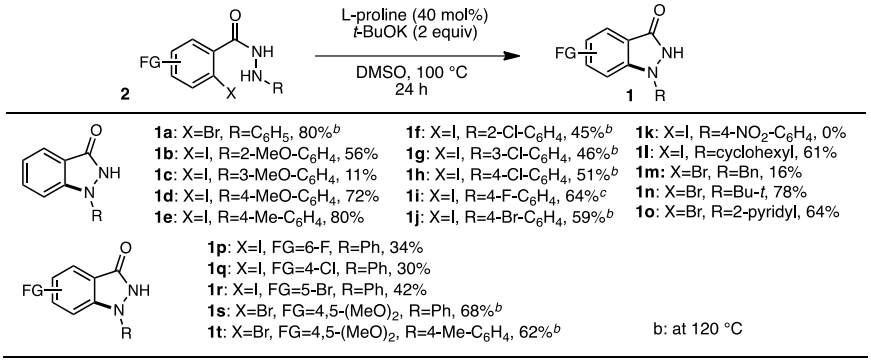
発表責任者：千葉一裕（chiba@cc.tuat.ac.jp）

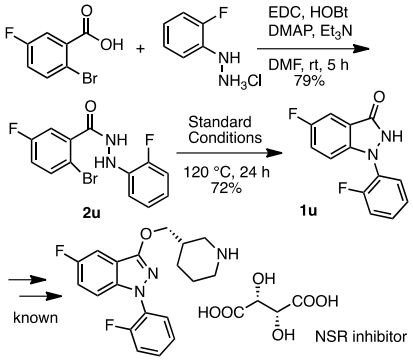
講演番号：2A16p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A16 会場

プロリン触媒下塩基によるインダゾロンの簡便合成
Facile synthesis of indazolones under the presence of base and proline as catalyst
○谷森 紳治、辻井 美穂、園田 素啓（阪府大院生環）
○Shinji Tanimori, Miho Tsujii, Motohiro Sonoda (Osaka Prefecture Univ.)

【背景・目的】演者らは以前本大会において、2-ハロ安息香酸とヒドラジンから調製したヒドラジド **2** に対し、プロリン触媒の存在下塩基を作用させることにより、環化体であるインダゾロン **1** が生成することを報告した[1]。しかしその適用例は限定出来なものであった。そこで今回、本反応を利用して様々な置換インダゾロン誘導体の合成や、反応機構の考察、ならびに医薬品中間体の合成を行ったので報告する。

【方法・結果】前回の報告では、**2** の脱離基 X としてヨウ素を用いていたが、種々条件検討の結果、臭素体においても反応温度を若干高めにすることで（１２０ ℃）良好な収率（８０％）で環化体が得られることがわかった(**1a**)。また、窒素原子に置換したベンゼン環上に様々な電子求引ならびに供与性置換基を導入して反応を行った結果、収率に若干のばらつきが見られるものの環化体が中程度からよい収率で得られることがわかった（**1b**–**1j**）。一方、ニトロ基置換体では生成物は得られなかった（**1k**）。また、芳香環の変わりにシクロヘキシル、ベンジル、*t*-ブチル、2-ピリジル基を導入したヒドラジド **2** からもベンジル基を除いてよい収率で生成物が得られた（**1l**–**1o**）。安息香酸側の芳香環への置換基導入は、電子求引性基では収率は低下したが、供与性基ではよい収率で環化体が得られた（**1p**–**1t**）。反応系中に 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル(TEMPO)を共存させたところ、反応が著しく阻害されたことから、ラジカル経由の反応であることが示唆された。本反応を応用して、NSR 阻害剤中間体 **1u** の合成を行った[2].





[1] 日本農芸化学会 2015 年度大会, 3E21a07. [2] Tanimori, S. *et al. J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6766.

indazolone, synthesis, radical reaction

発表責任者：谷森紳治（tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A16p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A16 会場

γ-Carboline 誘導体の簡便な合成法の開発

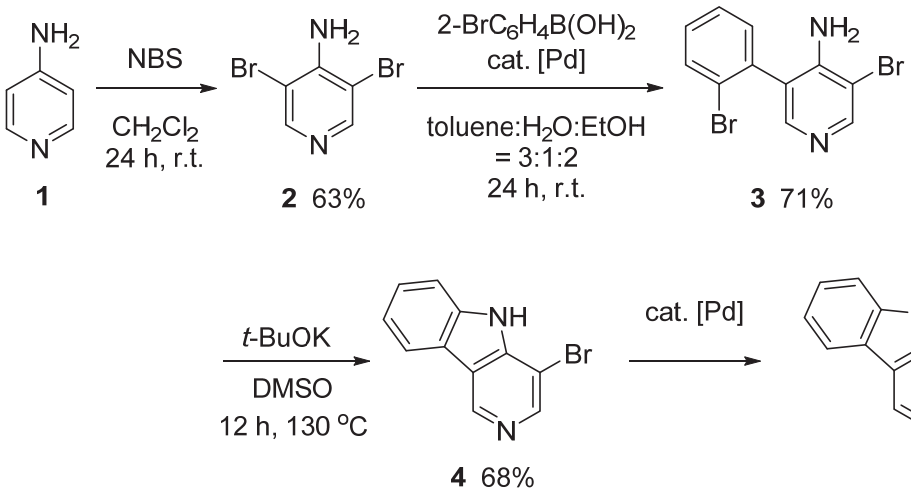
Convenient Synthesis of γ-Carboline Derivatives

○三好 康平、園田 素啓、谷森 伸治 (阪府大院生命環境)
○Kohei MIYOSHI, Motohiro SONODA, Shinnji TANIMORI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】

Pyrido[4,3-*b*]indole は γ-carboline とも呼ばれ、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、およびヒスタミンやセロトニンのような重要な神経伝達物質によって引き起こされる作用の阻害剤として注目されている。また、γ-carboline は抗癌剤として知られる ellipticine や olivacine に類似の構造を有することから、γ-carboline の誘導体にも強い抗癌活性を示す可能性が期待されている。以上の観点から、γ-carboline 誘導体は生物学的および医学・薬学的に重要であり、それらを簡便に、かつ効率良く合成する方法の開発に興味が持たれている。γ-Carboline は、従来ベンゾトリアゾールやピリドトリアゾールを用いた Graebe-Ullmann 反応による閉環、フェニルヒドラゾンやピリジニルヒドラゾンを用いた Fischer 反応による閉環、またはインドール誘導体を用いたイソキノリン環の形成によって合成されてきた。しかし、出発物質が入手困難であることや適用可能な基質の一般性の観点で問題があった。そこで本研究では、様々な置換基を有する γ-carboline 誘導体の新規合成法の開発を目的とした。

【方法・結果】



入手容易な 4-アミノピリジン（**1**）を出発物質とし、*N*-ブロモスクシンイミドによりブロモ化を行ってジブロモピリジン **2** を導いた。次に、アリールボロン酸とのパラジウム触媒クロスカップリング反応を制御して行うことによってフェニルピリジン **3** を主生成物として得た。続いて、塩基を用いた環化によって三環性の γ-carboline の臭素誘導体 **4** を合成した。さらに、**4** のブロモ基に着目し、この位置でのパラジウム触媒を用いるクロスカップリング反応について検討した。

Carboline, 4-Aminopyridine, Cross coupling

発表責任者：三好康平（koheiii2backnumber@gmail.com）

講演番号：2A17a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A17 会場

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）が産生するフェアリー化合物の生合成酵素遺伝子群の探索
Search for genes encoding the biosynthetic enzyme of fairy chemicals in *Lepista sordida*

○伊藤 彰将[1]、竹村 太秀[1]、崔 宰熏[1,2]、鈴木 智大[3]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,6]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]宇都宮大・バイオ、[4]東海大・創造、[5]静県大・薬、[6]静大院・創造）

○ Akinobu Ito[1], Hirohide Takemura[1], Jae-Hoon Choi[1,2], Tomohiro Suzuki[3], Hideo Dohra[2], Hirofumi Hirai[1,2], Tomohiro Asakawa[4], Makoto Inai[5], Toshiyuki Kan[5], Hirokazu Kawagishi[1,2,6] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Center for Biosci. Res. and Educ., Utsunomiya Univ., [4]Inst. of Innov. Sci. and Technol., Tokai Univ., [5]Dept. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [6]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) の菌糸体培養濾液から、天然物として初めて単離された 2-azahypoxanthine (AHX) 及び imidazole-4-carboxamide (ICA) は、これまでに試験した全ての植物に対して成長調節活性を示し、植物に様々なストレス耐性を付与することが判明している[1-3]。さらに、これらが植物や菌類に普遍的に内生している可能性が明らかになっている[3]。以上のことから我々は、両化合物が植物や菌類における新規のホルモンであるという仮説を立てた。しかし、生体内における生合成経路は未解明な点が多い。前回大会に引き続き、本研究では、AHX 及び ICA が天然物として初めて単離されたコムラサキシメジにおける両化合物の生合成経路の解明を目的とし、両化合物の生合成酵素遺伝子群の探索を行った。

【方法・結果】

これまでの研究で、コムラサキシメジにおいて両化合物はプリン代謝経路から生合成され、その初発反応には adenine phosphoribosyltransferase (APRT) が関与することが示唆されている[4,5]。そこで、APRT を大腸菌を宿主として異種発現させた結果、予想生合成前駆体である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR) から 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) への変換反応が *in vitro* において証明された。

更に、AICA から両化合物への変換反応には、nitric oxide synthase (NOS) が関与することが示唆されている[6]。興味深いことに、*in silico* 解析の結果、コムラサキシメジは NOS 遺伝子を 8 個有していることが判明し、これは現在確認されている担子菌類において、コムラサキシメジのみが有する特徴であることが明らかになった。NOS がコムラサキシメジにおける両化合物の生合成の鍵を握っている可能性を考え、NOS の大腸菌を宿主とした異種発現系の構築にも着手しており、現在詳細に研究を進めている。

【参考文献】

1) Choi, JH. *et al*. *ChemBioChem* **11**, 1373－1377 (2010).
2) Choi, JH. *et al*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956－9959 (2010).
3) Choi, JH. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **53**, 1552－1555 (2014).
4) 伊藤 彰将ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 132 (2016).
5) Suzuki, T. *et al*. *Sci. Rep*. **6**, 39087 (2016).
6) 伊藤 彰将ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1139 (2017).

adenine phosphoribosyltransferase, nitric oxide synthase, *Lepista sordida*

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A17a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A17 会場

フェアリー化合物 2-azahypoxanthine のコムラサキシメジにおける生合成研究
Biosynthetic studies of fairy chemical, 2-azahypoxanthine, in *Lepista sordida*

○古田島 美颯[1]、崔 宰熏[1,2]、道羅 英夫[2]、鈴木 智大[3]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[5]、菅敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,6]([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]宇都宮大・バイオ、[4]東海大・創造、[5]静県大・薬、[6]静大院・創造)
○ Mihaya KOTAJIMA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hideo DOHRA[2], Tomohiro SUZUKI[3], Hirohumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[4], Makoto INAI[5], Toshiyuki KAN[5], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,6] ([1]Fac. of Agric., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Center for Biosci. Res. and Educ., Utsunomiya Univ., [4]Inst. of Innov. Sci. and Tech., Tokai Univ., [5]Sch. of Phar. Sci., Univ. of Shizuoka, [6]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) 菌糸体培養濾液から単離された2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) は、植物成長調節活性を有することが示されたが[1,2]、これらの生合成経路は一部しか解明されていない[3]。そこで本研究では、特にAHXの生合成経路の解明を目的として、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いた生合成に関与する遺伝子群の同定を試みた。

【方法・結果】

コムラサキシメジ菌糸体を培養し、菌体破砕後の培養濾液をHPLC分析に供したところ、培養3日目にAHX産生能が高く、培養21日目に低くなった。そこで、培養3日目と21日目の菌糸体からtotal RNAを抽出し、作成したライブラリーを用いて、両末端150 bpのPaired-endでシーケンスを行った。発現差解析 (edgeR) によって、有意に発現量が増加及び減少した遺伝子群については、アノテーション (BLAST, KEGG) を行った。AHXはプリン代謝経路によって生合成されると示唆されており、nitric oxide synthase (NOS) によってL-arginineからL-citrullineの変換時に生成するNOが窒素源として関与すると考えられる。発現差解析の結果、AHX産生能の高い時期に、L-arginineの代謝経路におけるNOの生成に関与する遺伝子群と、プリン代謝経路に関与する多くの遺伝子群の発現量が増加することが示唆された。

また、当研究グループはAHXがAHX-ribotide (AHXR) から生合成される可能性も考えた。この変換反応を触媒する酵素として、ホスホリボースの付加及び脱離反応を担うhypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) に着目し、コムラサキシメジのゲノムデータベースで類似した遺伝子を探索した。その結果、類似した配列を持つ*hpt1*の存在を確認した。*hpt1*は発現差解析の結果から、AHX産生能の高い時期に高発現することが確認されている。現在、*hpt1*の大腸菌を宿主とした異種発現を行い、詳細に研究を進めている。

1) Choi, J-H. *et al*. *ChemBioChem* 11, 1373-1377 (2010).
2) Choi, J-H. *et al. J. Agric. Food Chem.* 58, 9956-9959 (2010).
3) Suzuki, T. *et al. Sci. Rep.* 6, 39087 (2016).

fairy rings, *Lepista sordida*, biosynthesis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A17a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A17 会場

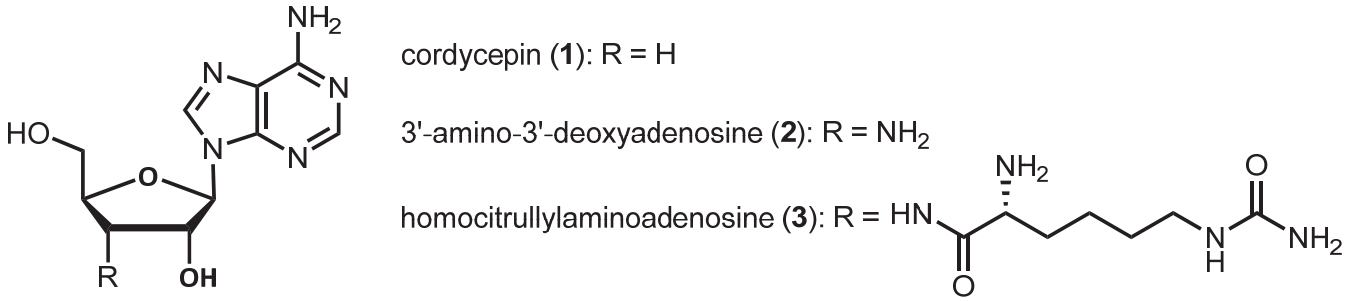
冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における 3'-amino-3'-deoxyadenosine の生合成経路の解析

Dissection of 3'-amino-3'-deoxyadenosine biosynthetic pathway in the mushroom *Cordyceps militaris*.

○天内 優子[1]、崔 宰熏[1,2]、恒松 雄太[3]、渡辺 賢二[3]、道羅 英夫[2]、鈴木 智大[4]、平井 浩文[1,5]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]宇都宮大・バイオ、[5]静大院・創造)

○ Yuko AMANAI[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Yuta TSUNEMATSU[3], Kenji WATANABE[3], Hideo DOHRA[2], Tomohiro SUZUKI[4], Hirohumi HIRAI[1,5], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Grad. Sch.of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]C-Bio, Utsunomiya Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】昆虫などに寄生し生育するキノコ（冬虫夏草）の一つであるサナギタケ *Cordyceps militaris* は栄養補助食品や生薬として広く利用されてきた。*C. militaris* からは抗生物質である cordycepin (**1**) の他[1,2]、いくつかの類縁体 (**2**, **3**)が単離されている[3,4]。我々はこれらの化合物に注目し、*C. militaris* のゲノム配列情報から生合成遺伝子を探索した。その結果、**3** と類似の化学構造を持つ puromycin の生合成遺伝子と相同性の高い遺伝子がクラスターとして存在していることを見出した。これらの酵素遺伝子の機能について、これまでに *cgp1622* の 5'-nucleotidase 活性を確認した[5]。この遺伝子クラスターの働きによって *C. militaris* を利用した新しい化学構造の抗生物質の創出ができる可能性に期待し、更に機能解析を試みた。



【方法・結果】*C. militaris* のゲノム配列情報から見いだされた遺伝子のうち、*cgp1620* は BLAST データベース上で 1 つの ORF に oxidoreductase と aminotransferase の 2 つの異なる機能性ドメインを有するとアノテーションされており、ATP のリボース 3 位の水酸基を酸化・アミノ基転移反応を触媒する酵素遺伝子と高い相同性を示した。*C. militaris* の cDNA を取得し配列を明らかにするとともに、現在、大腸菌宿主系から得られる組換え体酵素の取得を行っており、その酵素活性の確認を行ったので結果を合わせて報告する。

(1) Cunningham, K. G. *et al.*, *Nature*, 166, 949 (1950). (2) Yu, R. *et al.*, *Fitoterapia*, 75, 465-472 (2004). (3) Guarino, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 12, 3300-3302 (1961). (4) Jimenez, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 1579-1590 (1996). (5) 天内 優子ら, 2017 年度本大会要旨集

Cordyceps militaris, cordycepin, biosynthesis

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A17a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A17 会場

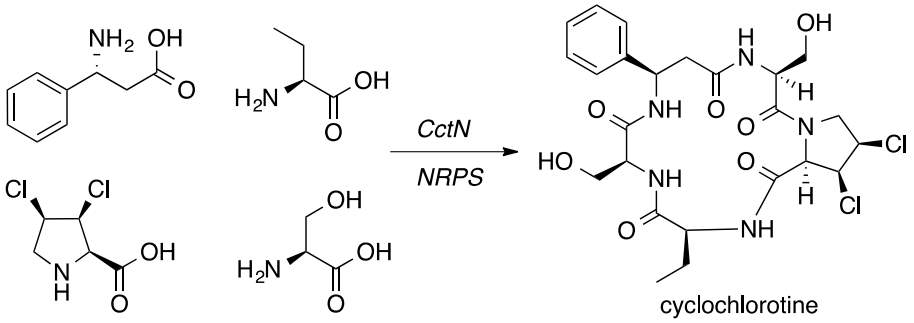
CRISPR/Cas9 System を用いた cyclochlorotine の生合成研究
Biosynthetic study on cyclochlorotine using CRISPR/Cas9 system

叶 英[1]、○劉 成偉[1]、尾﨑 太郎[1]、南 篤志[1]、丸山 潤一[2]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]東大院・農生科・応生工)
Ying YE[1], ○Chengwei LIU[1], Taro OZAKI[1], Atsushi MINAMI[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo.)

【目的】近年、効率的なゲノム編集方法として CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 システムが注目を集めている。このシステムは標的配列を特異的に切断することで遺伝子の欠損や挿入変異を引き起こすことが可能であり、現在、動物・植物・微生物などの様々な種類の細胞や生物種において利用が進められている。しかし、糸状菌が生産する有用二次代謝産物への適用例は少ない。これまでに丸山らは麹菌 *Aspergillus oryzae* における CRISPR/Cas9 システムを確立している[1)]。本研究ではゲノム編集用プラスミドを利用して、他属の糸状菌に適用可能なプラスミドを構築した。これを用いて *Talaromyces islandicus* が生産する非リボソームペプチドである cyclochlorotine の生合成経路の解明を試みたので結果を報告する。

【方法・結果】 初めに、*T. islandicus* に適用可能なゲノム編集用プラスミドを以下のように構築した。丸山らが構築した ppAsAcas9 を鋳型として、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*)、および cas9 を発現するためのプロモーターとターミネーター配列、大腸菌用複製起点などとともにギブソンアッセンブリー反応に供し、プラスミド ptrpcCas9 を構築した。なお、プロモーターとターミネーターは *T. islandicus* で機能することがわかっている *A. nidulans* 由来 *trpC* 遺伝子のものを選択した。

構築したプラスミドを用いて cyclochlorotine 骨格形成に必要な遺伝子 *cctN* (NRPS)[2)] への変異導入を試みた。初めに *cctN* 遺伝子内の配列を標的とする gRNA を *A. oryzae* 由来 U6 プロモーター・ターミネーターの制御下に配置した DNA 断片を調製し、In-fusion 法で ptrpcCas9 に導入した。構築したプラスミドを、プロトプラスト-PEG 法を用いて *T. islandicus* 野生株に導入し、形質転換体の取得を試みた。得られたハイグロマイシン耐性株の標的部位の配列を確認した結果、変異が起こったことが確認された。現在、この形質転換体の代謝産物の分析、および他の遺伝子への変異導入を検討している。特に塩素化の導入時期の確認を行なっている。



1) *Biotechnol. Lett*. **2016**, *38*, 637-642.; 2) *Environ Microbiol*. **2016**, *18*, 3728-3741.

CRISPR/Cas9, NRPS, cyclochlorotine

発表責任者：及川　英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

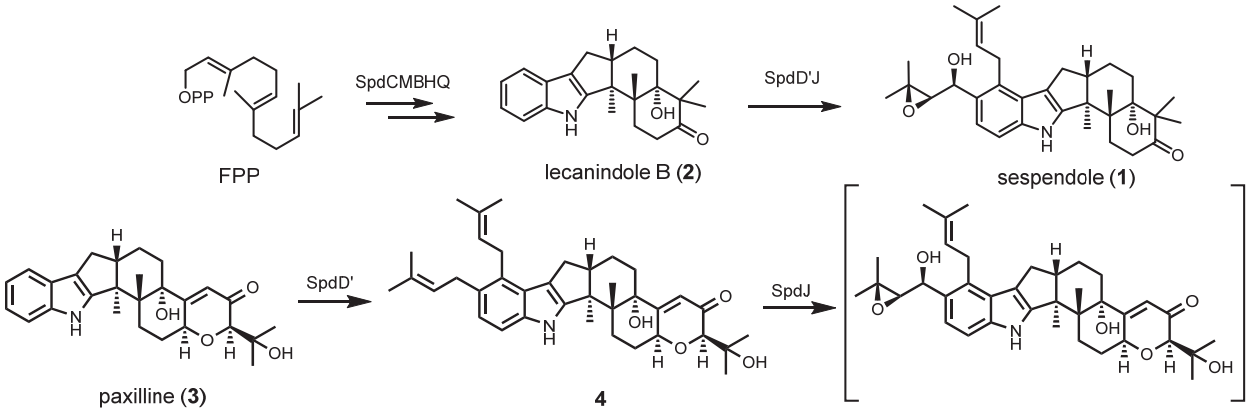
講演番号：2A17a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A17 会場

糸状菌が生産するインドールセスキテルペンの生合成研究（３）
Reconstitution of biosynthetic machinery for indole sesquiterpene isolated from filamentous fungi (3)

○工藤 洸星[1]、松本 知之[1]、劉 成偉[2]、尾﨑 太郎[2]、五味 勝也[3]、南 篤志[2]、及川 英秋[2]（[1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農）
○Kousei KUDOU[1], Tomoyuki MATSUMOTO[1], Chengwei LIU[2], Taro OZAKI[2], Katsuya GOMI[3], Atsushi MINAMI[2], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ.)

【背景】セスペンドール（**1**）は、糸状菌 *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 から単離されたマクロファージの脂肪滴形成の阻害活性を有するインドールセスキテルペンである。構造的な特徴としては、インドール環にエポキシアルコールを備えた C5 ユニットが置換していることがあげられる。その構造から、**1** の生合成におけるインドール環の修飾反応は、我々がこれまでに明らかにしてきたインドールジテルペンであるアフラトレム、ペニトレム、シアリニンにおける修飾反応とは異なることが期待された。本研究では、生合成マシナリーの再構築により修飾反応に関わる酵素遺伝子を特定するとともにその機能解析を行った。

【実験手法と結果】一昨年の本会において、我々は６種の遺伝子からなるセスペンドール生合成遺伝子クラスターを報告している[1]。また、骨格構築に関わる３種の遺伝子を麹菌へと導入することで、５環性の 9-deoxy-7-epilecanindole D の生産を確認していた[2]。今回、残る４種の修飾酵素遺伝子を２種の発現用ベクター（pAdeA2、pUSA2）に連結して先の形質転換体に追加導入したところ、**1** の生産を確認した。また、導入する遺伝子の組み合わせを変えることで生合成中間体である lecanindole B（**2**）も取得した。これより、インドール環の修飾を担う酵素遺伝子の特定に成功した。また、インドール環に置換基をもたないインドールジテルペン・パキシリン（**3**）を修飾酵素遺伝子導入株に投与したところ、ジプレニル化体 **4** とその酸化生成物の生産を確認した。現在、生成物の構造を確認中であり、連続したプレニル化と酸化反応で多様な骨格が形成される機構について議論する予定である。



1）日本農芸化学会 2016 年度大会 4B019, 2）日本化学会 第 97 春季年会 1C7-42

indole sesquiterpene, sespendole, Aspergillus oryzae

講演番号：2A17a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A17 会場

イネにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する生化学的な研究

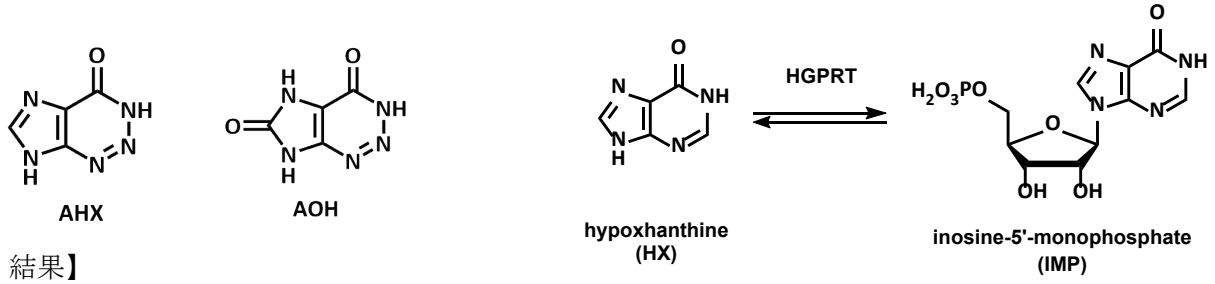
Biochemical studies on biosynthetic pathway of plant growth regulator in rice

○竹村 太秀[1]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、稲井 誠[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,5]([1]静岡大院・農、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡県立大・薬、[4]東海大・創造、[5]静岡大院・創造)
○Hirohide TAKEMURA[1], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Makoto Inai[3], Tomohiro Asakawa[4], Toshiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,5] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Phar. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]Inst. of Innov. Sci. and Tech.,Tokai Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

芝草がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象はフェアリーリングと呼ばれている。本研究室ではフェアリーリング惹起物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA) 及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) を単離し、これらの化合物をフェアリー化合物 (fairy chemicals, FCs) と総称している[1-3]。また、FCs は植物に普遍的に内生しており、植物成長調節活性を有していることから、FCs の生合成経路について様々な研究が行われている[1-3]。

これまで FCs は 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) から生合成される経路を明らかにしたが[3]、我々は hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) によってリボチド体を中間体とした新たな FCs 生合成経路の存在も推定した。そこで、イネ由来の HGPRT (OsHGPRT) を異種発現し、FCs に対する基質特異性を調査したところ、AHX 及び AOH がホスホリボシル化されることが明らかとなった[4]。そこで、OsHGPRT の機能解明及び rOsHGPRT によって新規化合物である AOH-ribotide を合成し、単離・構造決定を目的とした。



【方法・結果】

OsHGPRT を含むプラスミドを大腸菌を用いて異種発現し、Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製を行った。これにより得られた酵素液を AHX、AOH、ICA、AICA、HX、adenine を基質として酵素反応を行ったところ、AHX、AOH、hypoxanthine においてホスホリボシル化が確認された。また、この内 AOH を基質として大量合成を行い、酵素反応生成物の単離に成功した。現在、構造決定及びその生物活性を検討中である。

1) J.-H. Choi *et al. ChemBioChem*. 11. 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi *et al. J. Agric. Food Chem.* 58. 9956-9959 (2010)
3) J.-H. Choi *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 53. 1553-1555 (2014)
4)崔ら, 平成 28 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy chemicals, fairy ring, *Oryza sativa*

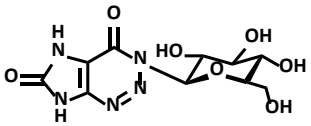
講演番号：2A17a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A17 会場

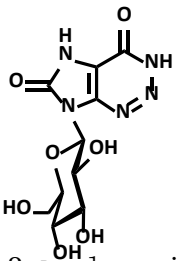
コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質の代謝産物に関する化学的研究
Chemical studies on metabolites of plant growth-regulating substances from the faily ring-forming fungus Lepista sordida

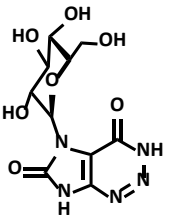
○與五澤 薫[1]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、稲井 誠[3]、浅川 倫宏[4]、管 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,5]([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静岡県大・薬、[4]東海大・創造、[5]静大院・創造)
○ Kaoru YOGOSAWA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Makoto INAI[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[3], hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]IIST, Tokai Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

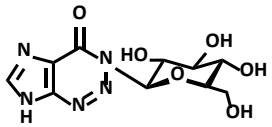
【目的】

我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）の培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine（AHX）を単離した[1)]。AHX は植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され[2)]、この AOH もまた植物成長調節活性を有している[3)]。これまでの本大会で、AHX あるいは AOH を処理したイネの抽出物から下図のように AOH のβ-グルコシドである化合物 3 種及び AHX のβ-グルコシドを単離したことを発表した[3,4)]。本研究では、AHX、AOH の植物体内におけるさらなる代謝産物の単離を目的とした。


AOH-1-β-D-glucoside


AOH-9-β-D-glucoside


AOH-7-β-D-glucoside


AHX-1-β-D-glucoside

【方法・結果】

2 週間 AHX 溶液中で培養したイネを地上部と根に切り分け、エタノール、アセトンで順次抽出し、得られた可溶部を減圧濃縮後、HPLC による分析を行った。分析の結果、無処理のイネに見られない新たな代謝産物の存在が示唆されたため、各種クロマトグラフィーに供し、精製を行った。現在、この化合物について構造解析を行うとともに、更なる代謝産物の探索を行っている。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田翔伍ら、平成 24 年度農芸化学会大会講演要旨集
4) 澤田梓ら、平成 26 年度農芸化学会大会講演要旨集

fairy chemicals, metabolism, rice

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A17a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A17 会場

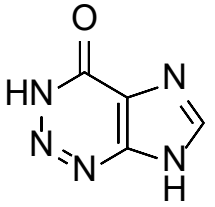
イネにおけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine (AHX) 及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) の配糖化に関与する糖転移酵素に関する化学的研究

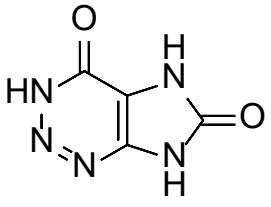
Chemical studies on glucosyltransferase to form glucosides of fairy chemicals, 2-azahypoxanthine and 2-aza-8-oxohypoxanthine, in rice

○崔 宰熏[1,2]、近藤 遼一[1]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]東海大・創造、[4]静岡県大・薬、[5]静大院・創造)
○Jae-Hoon CHOI[1,2], Ryoichi KONDOH[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]IIST, Tokai Univ., [4]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHX が植物内で内生されていることを報告した[1,2]。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝され、この AOH も植物成長調節活性を有することが確認されている[2]。さらに、2013 年度本大会において植物内から AHX 及び AOH の代謝産物が検出され、これらはβ-D-グルコシドであると報告した[3]。これらの化合物の生成には glucosyltransferase の関与の可能性が示唆された。本研究では、この酵素を同定することを目的とした。


AHX


AOH

【方法・結果】

イネの培養細胞を 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で抽出を行い、40%と 70%の濃度で順次硫安沈殿を行った。70%硫安沈殿画分を弱陰イオン交換クロマトグラフィー (Macro-Prep DEAE) で分画後、各画分に AOH を添加し酵素活性試験を行った。これらを LC-MS/MS で分析したところ、一部の画分で AOH-グルコシドの生成が確認できた。この酵素活性を指標に活性画分を各種クロマトグラフィーでさらに分画した。活性画分を SDS-PAGE に供し、得られたバンドからペプチドを抽出した。その抽出物をトリプシン消化後、LC-MS/MS に供し、Mascot 解析により酵素を同定した。また、同定した OsUGT 遺伝子を大腸菌を宿主として異種発現させた。rOsUGT は AOH 及び AHX のグルコシル化に関与することが明らかになった。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.,* 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田 翔伍ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy chemicals, fairy ring, glucosyltransferase

講演番号：2A17a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A17 会場

トウガラシ属植物におけるカプシノイド生合成とエンドファイトの関連
Relationship between capsinoid biosynthesis and endophyte in Capsicum plant
○神戸 豪、金島 一樹、中谷 祥恵、古旗 賢二 (城西大薬)
○Takeshi Kambe, Itsuki Kaneshima, Sachie Nakatani, Kenji Kobata (Josai Univ.)

【目的】トウガラシに含まれるカプサイシン（CAP）には体脂肪蓄積抑制作用等の報告があるが、刺激が強烈なため機能性食品への利用は困難である。近年、CAP の類縁化合物として発見されたカプシエイト（CST）は CAP と同等の作用を持ちながら刺激性が低いため医薬品や機能性食品の新たな素材として注目されている。CAP は、トウガラシ果実内でバニリン（V）から生成するバニリルアミン（VNH_2）を経て生合成される。CST は、V から生成するバニリルアルコール（VOH）を経て生合成されるが、V から VOH への代謝メカニズムは明らかになっていない。先行研究で、トウガラシ果実内から単離した内生菌(エンドファイト)に V を添加したところ VOH を生成したことから、CST の生合成にはエンドファイトが関連している可能性が考えられた。本研究では、CST 生合成における V から VOH 代謝へのエンドファイトの関連を明らかにすることを目的とした。
【方法】トウガラシ辛味品種“ハバネロ”と無辛味品種“CH-19 甘”の果実を採取、表面滅菌した後、クリーンベンチ内で胎座・隔壁を摘出した。胎座・隔壁をホモジナイズして得られた懸濁液を①とし、胎座・隔壁から単離したプロトプラストを②とした。①、②液に V 溶液、V+抗生剤(AB)溶液を添加し 25℃で①は 1 日間、②は 2 日間インキュベートし、VOH、VNH_2、バニリン酸(VAC)の生成量を HPLC で測定した。①、②液の反応終了時の一部を標準寒天培地に塗布し、25℃で 1 日間インキュベートしてエンドファイトの有無を調べた。
【結果】①の条件においてハバネロでは V 添加で VOH、VAC が顕著に生成した。一方、V+AB の添加では VOH、VAC は生成しなかったが、VNH_2 は生成した。CH-19 甘でも V の添加で VOH、VAC が生成し、V+AB 添加では VOH、VAC、VNH_2 は生成しなかった。②の条件においてもハバネロと CH-19 甘で V 添加は VOH を生成し、V+AB 添加は VOH を生成しなかった。①、②液の反応液のうち、V 添加群は寒天培地上にコロニーを形成し、V+AB 群ではコロニーを形成しなかった。
【考察】トウガラシ辛味、無辛味品種の胎座・隔壁の懸濁液、プロトプラストで V→VOH の変換が見られ、抗生剤添加により変換が阻害された。抗生剤の無い場合は反応液から菌が検出された。一方、辛味品種胎座・隔壁では抗生剤の有無に関わらず V→VNH_2 の変換が見られたことから、いずれの条件でも植物酵素は働いていると考えられた。以上のことから、トウガラシ果実での CST 生合成における V→VOH の変換は植物酵素ではなくエンドファイトが担っている可能性が高まったと考えられた。

Capsicum, Capsiate, endophyte

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2A17a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A17 会場

ササユリ（*Lilium japonicum*)の二次代謝産物分析
Analysis of secondary metabolites in *Lilium japonicum*
○藤澤 瑞希[1]、松川 哲也[1]、瀧川 義浩[5]、荒井 滋[2]、柳川 綾[4]、秋野 順治[3]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大学生物理工、[2]大神神社、[3]京都工繊大・CBFS、[4]京都大学・RISH、[5]近畿大学先端研)
○Mizuki Fujisawa[1], Tetsuya Matsukawa[1], Yoshihiro Takikawa[5], Shigeru Arai[2], Aya Yanagawa[4], Toshiharu Akino[3], Shin'ichiro Kajiyama[1] ([1]BOST, Kindai Univ., [2]Omiwa Shrne, [3]CBFS,Kyoto Inst. Technol, [4]RISH, Kyoto Univ., [5]Plant center, Kindai Univ.)

[目的]
ササユリ（*Lilium japonicum*）はユリ科ユリ属に属する日本固有の球根植物であり、西日本の山間部を中心に自生している。本植物は、古くから観賞用、食用、薬用などに用いられており、約 1300 年前から奈良県大三輪神社摂社率川神社に伝わる三枝祭では、その花弁が御献花として用いられるとともに、花を持ち帰り飾ると「疫病除け」になると言い伝えられてきた。これらの背景から、本植物は何らかの生理活性を有する代謝産物を産生することが期待される。 一方で、本植物は野生種であり、遺伝的多様性が大きく、産地による代謝産物の違いも大きいと考えられる。また、本植物は近年、獣害や乱獲によりその個体数が著しく減少し、多くの地域で絶滅種あるいは絶滅危惧種に指定されている。さらに、本植物は播種から初回の開花までに約 6 年を要するなど、研究材料の入手が困難であり、1970 年代以降はほとんど成分研究が行われてこなかった。 このような中、我々は、ササユリの組織培養による増殖研究や、大神神社との共同研究に取り組むことにより、植物材料を確保するとともに、二次代謝産物を主とする成分研究と、その生理活性の検討を開始した。本発表では主にササユリ花弁の香気成分および、不揮発性二次代謝成分の分析を行ったので報告する。

[方法および結果]
植物材料は、大神神社で栽培、管理されているササユリ（豊橋産、上牧産、伊島産、岡崎産、和歌山産）および、組織培養株を用いた。 香気成分の収集には、モノリス型固相吸着剤 MonoTrap を使用し、開花後の花弁内の雄しべ・雌しべを含む生殖器官を囲むように円盤型および筒型の固相吸着剤を設置した。また、香気成分を効率よく収集するため、ビニール袋で花全体を密封し、一晩静置した。吸着後の MonoTrap をジクロロメタンで溶出し、その溶出液を GC/MS 分析に供した結果、多くの産地で共通にみられる Linalool、2,2,6-trimethy-6-ethenyltetrahydro-2H-Pyran-3-ol などの化合物の他、Phenyl acetaldehyde や、Benzyl acetate などの産地間で違いの見られる化合物など計 16 種類の香気成分が同定された。 現在、これらの生理活性の検討を行うため、抗菌活性試験を進めている。
一方、不揮発性二次代謝産物の分析では、和歌山産ササユリ花弁の酢酸エチル粗抽出物中に、駆虫活性の報告のある、vanillic acid、抗菌活性、抗酸化作用を有する kaempferol、4-hydroxybenzonic acid を同定した。これらの結果を併せて報告する。

Liliim japonicum, essential oil, Secondary metabolites

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

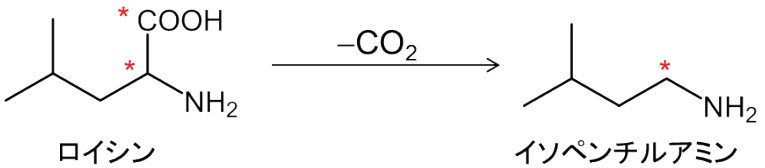
講演番号：2A17a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A17 会場

イネにおけるイソペンチルアミンの生合成
Biosynthesis of isopentylamine in rice
○網干 貴子[1]、飯塚 千晶[1]、寺石 政義[2]、奥本 裕[2]、森 直樹[2]、村山 哲也[1] ([1]山形大農、[2]京大院農)
○Takako ABOSHI[1], Chiaki IITSUKA[1], Masayoshi TERAISHI[2], Yutaka OKUMOTO[2], Naoki MORI[2], Tetsuya MURAYAMA[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Univ.)

植物は病原菌の感染や昆虫の食害に対し、化学的な応答を行う。イネでは、感染に対してモミラクトンなどの多様なジテルペン化合物やサクラネチンがファイトアレキシンとして増加する。食害に対しては、feruloylputrescine などのフェノール性アミドが増加する。本化合物をトビイロウンカに与えると、致死率が増加すると報告されている。病原菌に対する応答に比べると、イネでは食害に対する化学的応答があまり明らかとなっていない。そこで、アワヨトウ幼虫にイネ幼苗 (日本晴) を食害させ、1 日後に葉を 50%メタノール水溶液で抽出し代謝物を LC/MS で分析したところ、イソペンチルアミンが増加することを見出した。本化合物は、食害処理を与えていない葉からはほとんど検出されない。

イネ葉におけるイソペンチルアミンの増加は、ハサミによる傷害でも再現でき、傷害処理を行った個体であっても傷害葉ではイソペンチルアミンが増加するのに対し、非傷害葉では増加しなかった。また、イネ幼苗に様々な植物ホルモン水溶液 (1 mM) を噴霧し、1 日後のイソペンチルアミン量を測定した。ジャスモン酸を噴霧したイネでは、イソペンチルアミンが増加し、その蓄積量は 19.7±1.8 μg/gFW (n=5, mean±SEM) であった。一方、アブシジン酸、インドール酢酸、サリチル酸を噴霧した葉では増加しなかった。ジャスモン酸は傷害時に増加する植物ホルモンであることから、イネ葉では傷害によりジャスモン酸の増加を経て、イソペンチルアミンが増加すると考えられた。

また、[1,2-^{13}C]ロイシンをイネ幼苗に注射後に、ジャスモン酸を噴霧し、葉のイソペンチルアミンを分析した。イソペンチルアミンは 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate で誘導体を行うと、m/z 258[M+H]$^+$ (ESI-positive) で検出されるが、[1,2-^{13}C]ロイシンを注射したイネでは m/z 258 に対する m/z 259 の相対強度が 10%以上増加した。本結果から、^{13}C で標識されたイソペンチルアミンの生成が示唆され、ロイシンはイソペンチルアミンの前駆体と考えられた。



イソペンチルアミン生合成経路

rice, isopentylamine, response to insect damage

発表責任者：網干貴子（taboshi@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2A17a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A17 会場

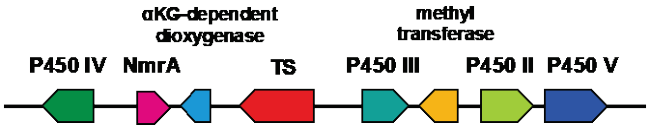
異種発現によるバナナ病原菌由来ジテルペン類の生合成研究
Studies on the biosynthesis of diterpenes produced during the infection of Pseudocercospora fijiensis

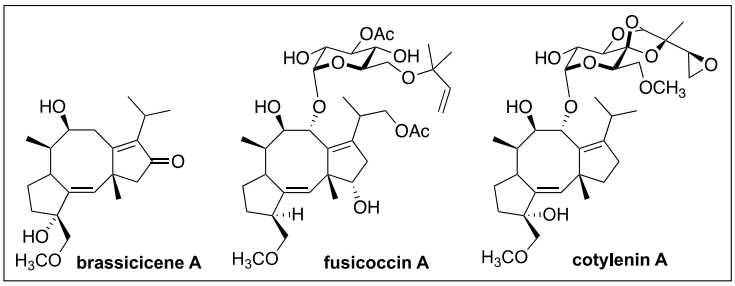
○田澤 聡大[1]、叶 英[2]、尾﨑 太郎[2]、劉 成偉[2]、南 篤志[2]、小笠原 泰志[3]、大利 徹[3]、及川 英秋[2]
([1]北大理、[2]北大院理、[3]北大院工)
○Akihiro TAZAWA[1], Ying YE[2], Taro OZAKI[2], Chengwei LIU[2], Atsushi MINAMI[2], Yasushi OGASAWARA[3], Toru DAIRI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [3]Fac. Eng., Hokkaido Univ.)

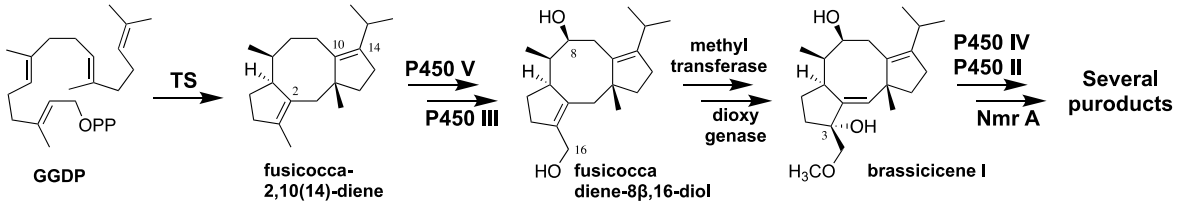
【目的】病原性真菌 *Pseudocercospora fijiensis* は，バナナに感染し黒シガトカ病を引き起こすことが知られている．近年の転写解析により，*P. fijiensis* ゲノム中に感染時その宿主に依存して発現量が増加する二次代謝遺伝子クラスターがあることが明らかになった [1]．以上より，感染時に生産される低分子化合物の存在が示唆された一方で，それらの化学構造に関する知見は得られていなかった．また，これらクラスターの１つは，*Alternaria brassicicola* ゲノム中のジテルペン brassicicene C の生合成遺伝子と高い相同性を示した．brassicicene 類は，ヒト骨髄性白血病細胞の分化に関与するジテルペングリコシド cotylenin A との構造類縁性から，その生合成研究が盛んに行われている天然物である [2,3,4]．そこで本研究では，麹菌異種発現系を用いて *P. fijiensis* が生産する二次代謝産物の同定，及びその生合成に関与する酵素の機能解析を行うこととした．

【方法・結果】麹菌異種発現系により，*P. fijiensis* クラスター中の各遺伝子の段階的な発現株を作製し，それぞれ代謝産物を確認した．既にホモログの機能解析がなされている５遺伝子（下図参照）の共発現株より，brassicicene I の合成に成功した．続いて，後期生合成への関与が予測される酸化酵素（P450 IV, II）遺伝子を brassicicene I 生産麹菌に導入したところ，複数の酸化生成物が検出された．現在，それらの化合物の同定及び，各酵素の詳細な機能解析を進めている．また，クラスター上の８遺伝子全てを導入した形質転換体の作製，解析も行なっている．

1) R. D. Noar and M. E. Daub *BMC Genomics* (2016) 17:690
2) A. Minami *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 870–874
3) M. Hashimoto *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5640–5643
4) Y. Ono *et al. J. Am. Chem. Soc.* 113 (2011) 2548–2555







Biosynthesis, Terpene, P450

講演番号：2A17a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A17 会場

病原性糸状菌が感染時特異的に生産するセスキテルペンの生合成研究

Studies on the biosynthesis of sesquiterpenes produced during the infection of pathogenic fungi

○瀧野 純矢[1]、南 篤志[2]、尾﨑 太郎[2]、劉 成偉[2]、白須 賢[3]、及川 英秋[2] ([1]北大理、[2]北大院理、[3]理研 CSRS)
○Junya Takino[1], Atsushi Minami[2], Taro Ozaki[2], Chengwei Liu[2], Ken Shirasu[3], Hideaki Oikawa[2] ([1]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]RIKEN CSRS)

【目的】ウリ科植物の炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* には 3 種以上のセスキテルペン生合成遺伝子クラスターが存在している。この内の 1 つは、植物に感染する過程でその転写量が増大していることが発現解析によって明らかにされた。感染過程における特定の段階において生産される二次代謝産物は,ナシ黒斑病菌がつくる AK-toxin(図 1)のように，植物の生体防御機構を抑制して菌の感染を成立させる因子と考えられる。本研究では麹菌異種発現系を用いて *C. orbiculare* の感染時特異的に発現する生合成遺伝子クラスターによるセスキテルペンの異種生産を行い最終産物の取得およびその活性の調査を目的とした。その詳細を報告する。

【方法・結果】*C. orbiculare* の感染時特異的に転写されているセスキテルペン環化酵素の周辺にはチトクローム P450 遺伝子（*P450*）やアルコール脱水素酵素遺伝子（*ADH*）が存在する。これらの修飾酵素遺伝子は環化酵素遺伝子と同じように転写量が増大していたことから，同一の天然物の生合成に関与することが強く期待された。そこで、これらの生合成酵素遺伝子を麹菌へと導入した形質転換体を構築し，その代謝産物を各種分光学的手法を用いて解析した。その結果，環化酵素導入株では既知のセスキテルペンである(+)-aristolochene(**1**),P450 追加導入株においては，3 種の酸化生成物(**2**, **3**, **4**)の生産を確認した。単離した化合物の構造から，以下に示すような酸化経路が予想された(図 2)。現在,その他の修飾酵素遺伝子を導入した形質転換体における代謝産物の解析を進めている。その詳細を発表する予定である。

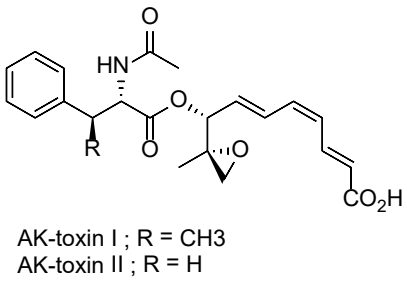


図 1 AK-toxin

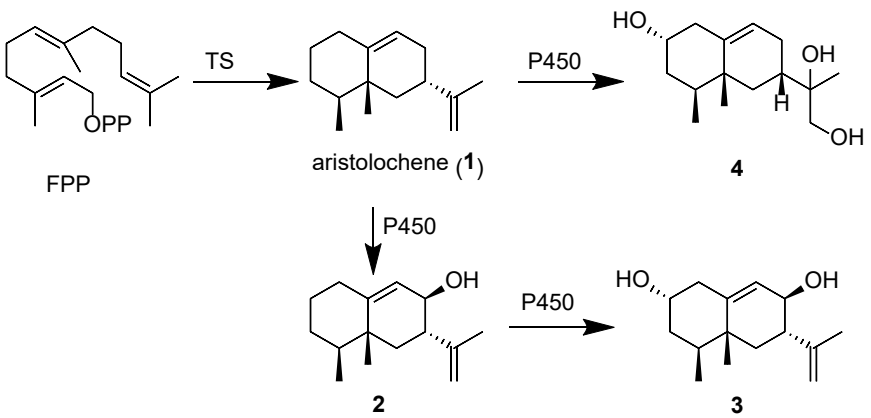


図 2 *C. orbiculare* 由来セスキテルペンの予想生合成経路

pathogenic fungi, sesquiterpene, heterologous production

講演番号：2A17a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A17 会場

麹菌異種発現系を用いたコニジオゲノンの異種生産

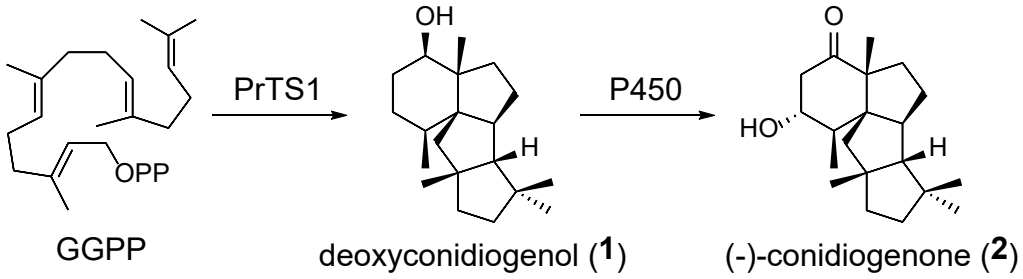
Heterologous production of conidiogenone using Aspergillus expression system

○椎名 哲也[1]、尾﨑 太郎[2]、劉 成偉[2]、越野 広雪[3]、南 篤志[2]、及川 英秋[2]([1]北大理、[2]北大院理、[3]理研 CSRS)

○Tetsuya SHIINA[1], Taro OZAKI[2], Chengwei LIU[2], Hiroyuki KOSHINO[3], Atsushi MINAMI[2], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]RIKEN CSRS)

【目的・背景】二機能性テルペン合成酵素は、N 末端領域に存在する環化酵素ドメインと C 末端領域に存在するプレニル基転移酵素ドメインからなり、GGPP などのプレニル二リン酸の合成とその環化反応を触媒する。*Phomopsis amidali* 由来の fusicoccadiene 合成酵素[1)]の発見を端緒として、これまでに 10 以上の二機能性環化酵素が同定・機能解析されている。我々が以前に同定した sesterfisherol 合成酵素 NfSS[2)]の配列をクエリとして二機能性テルペン合成酵素を探索したところ、*Penicillium roqueforti* のゲノム上に NfSS と 25%の相同性を示す新たな候補遺伝子 PrTS1 を見出すことができた。麹菌を宿主とした標的遺伝子の異種発現によって、本酵素の機能を解析したので報告する。

【方法・結果】標的遺伝子 PrTS1 を発現ベクターpTAex3 にクローニングし、麹菌に導入した。得られた形質転換体の代謝産物を分析した結果、形質転換体が deoxyconidiogenol（**1**）を生産することが明らかとなった。**1** の ^{13}C NMR においては複数のシグナルの広幅化が観測されたが、−80°C 下での測定ではシャープなシグナルが得られたため、**1** が常温条件では二つの安定配座を取りうることが示唆された。また、PrTS1 の周辺には、**1** の酸化修飾に関わると推測された P450 遺伝子が存在した。この遺伝子を PrTS1 と共発現したところ、conidiogenone（**2**）が生産されることがわかった。この結果より、この P450 が **1** の 2 段階の酸化反応を触媒することが示唆された。**2** は *Penicillium cyclopium* の分生子形成誘導物質として知られている天然物である[3)]。さらに、*Penicillium chrysogenum* からも PrTS1 と同様に deoxyconidiogenol の合成酵素が報告されていることから[4)]、本化合物が *Penicillium* 属に共通した代謝産物であることが示唆された。



1) T. Toyomasu, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007,** 104, 3084-3088.

2) Y. Ye, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 11846.

3) T. Roncal. *et al*. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6799.

4) 川出ら、第 58 回天然有機化合物討論会講演要旨集, 2016, pp.566

Terpene, Biosynthesis, Heterologous expression

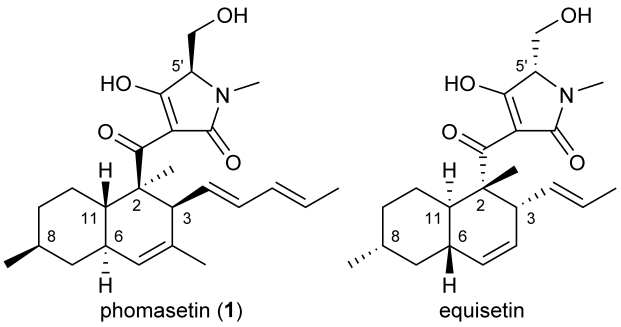
講演番号：2A17a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A17 会場

立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 ファミリーDiels-Alderase の機能解析

Genetic analysis of Fsa2-family Diels-Alderases responsible for the stereoselective decaline formation

○加藤 直樹[1]、野川 俊彦[2]、衣笠 清美[1]、高橋 俊二[1]、長田 裕之[2] ([1]理研 CSRS・天然物生合成、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Naoki Kato[1], Toshihiko Nogawa[2], Kiyomi Kinugasa[1], Shunji Takahashi[1], Hiroyuki Osada[2] ([1]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】Diels-Alder（DA）反応は、合成化学における最重要反応の 1 つである。近年、天然物生合成経路において本反応を触媒する酵素 Diels-Alderase（DAase）の発見が相次いでいる。我々もまた近年、*Fusarium* 属糸状菌の生産する equisetin の生合成経路において、立体選択的なデカリン形成を担う DAase 遺伝子 *fsa2* を発見した[1]。類縁化合物の生合成遺伝子クラスターとそこに含まれる *fsa2* ホモログを収集し、それらの機能・構造を比較することは、Fsa2 ファミリーが関与する立体選択的デカリン形成反応の分子レベルでの理解に重要である。そこで本研究は、分子内のすべての不斉点が equisetin とは反転している糸状菌代謝物 phomasetin（**1**）を対象に、その生合成遺伝子クラスターを同定し、そこに含まれる *fsa2* ホモログの生合成における役割・機能の解明を目的とした。
【方法と結果】はじめに、研究室が所有する土壌単離糸状菌約 1,600 株より生産菌の探索を行い、**1** の高生産糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株を得た。次に、生合成遺伝子同定のため、本菌株のゲノム解読を行った。その結果、ゲノム中には PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子が 1 つ含まれており、**1** の生合成への関与が予想される酵素遺伝子（enoylreductase、Fsa2 ファミリーDAase、メチル基転移酵素）が近傍に存在していた。これら遺伝子の生産菌における **1** の生合成への関与、ならびに生合成経路における役割を調べるため、ノックアウト実験を行った。PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子 *phm1* の欠失により、**1** の生産が消失することから、本遺伝子クラスターが生産菌において **1** の生合成に関与していることが示された。次に、*fsa2* ホモログである *phm7* 遺伝子欠失の代謝物生産への影響を解析したところ、**1** の大幅な生産低下に加え、新たな化合物ピークが検出された。当該化合物を分離精製し、各種スペクトル解析によりその化学構造を決定したところ、3 位と 6 位の立体化学が反転した **1** のジアステレオマーであった。以上の結果より、*phm7* もまた *fsa2* と同様に、立体選択的デカリン形成に関与していることが示唆された。



1. Kato N *et al*. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 210-215 (2015)

Diels-Alderase, decaline, biosynthesis

発表責任者：加藤　直樹（naoki-kato@riken.jp）

講演番号：2A17p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A17 会場

糸状菌が生産する cyclohelminthol 類の生合成研究

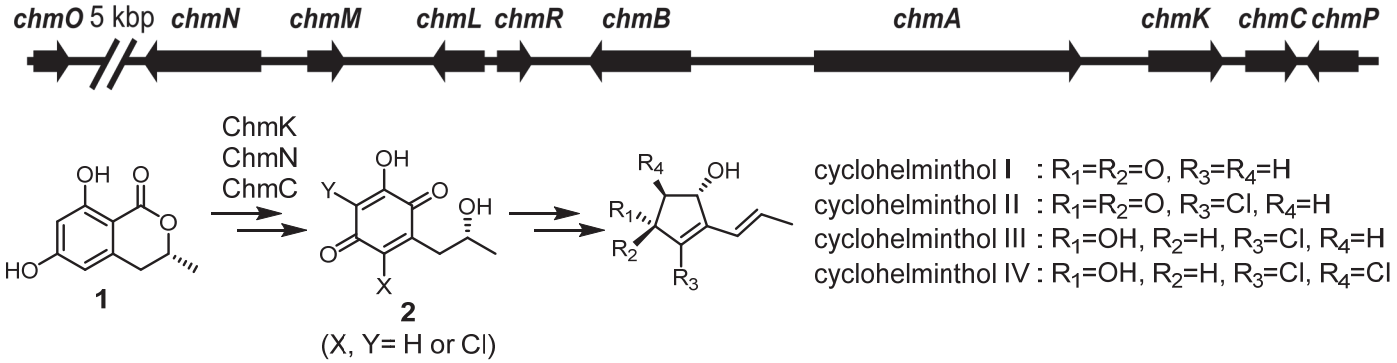
Biosynthetic study of cyclohelminthols

○鵜飼 孝大[1]、南 篤志[2]、田中 静也[3]、劉 成偉[2]、尾﨑 太郎[2]、橋本 勝[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]弘大院農)

○Takahiro UGAI[1], Atsushi MINAMI[2], Shizuya TANAKA[3], Chengwei LIU[2], Taro OZAKI[2], Masaru HASHIMOTO[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [3]Hirosaki Univ.)

【目的】糸状菌 *Helminthosporium velutinum* yone96 株より、シクロペンテン骨格を有する cyclohelminthol I と、その酸化度や塩素化様式が異なった類縁体が単離されている [1)]。しかし本化合物群の生合成遺伝子、および生合成経路は明らかにされていないため、本研究では麹菌を用いた異種発現と、大腸菌で調製した組み換えタンパク質での *in vitro* 解析により生合成遺伝子の機能解析を行った。

【方法・結果】cyclohelminthol 類の生産菌をドラフトゲノムシーケンス解析に供し、その生合成遺伝子を探索したところ、この菌株が下に示すような 10 個の遺伝子からなる *chm* クラスターを見出した。過去の知見 [2)]より骨格構築に必要と推定された *chmA, chmB* を麹菌に導入し異種発現すると、形質転換体は既知化合物である **1** を生産した。化合物 **1** は cyclohelminthol 類の生合成中間体であると考えられたため、さらに二つのハロゲン化酵素遺伝子 *chmK, chmN* を導入することで、化合物 **1** の塩素化体の生産を確認した。この後の修飾反応はジヒドロイソクマリン骨格の減炭反応が予測されたので、修飾酵素遺伝子の組換えタンパク質を調製して *in vitro* 解析を行った。化合物 **1** およびその塩素化体を基質として ChmC を *in vitro* で作用させたところ、新たな化合物が見られた。その NMR スペクトルは、キノン **2** であることを強く示唆していた。現在は *chm* クラスターにおける環縮小反応を触媒する遺伝子の検討を行っている。



1) Y. Honmura, *et al. Tetrahedron Lett.* **2016**, *72*, 1400.
2) C. Zaehle, *et al. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 719.

Biosynthesis, Polyketides, Heterologous expression

講演番号：2A17p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A17 会場

糸状菌アントラキノン系ポリケタイドの生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析

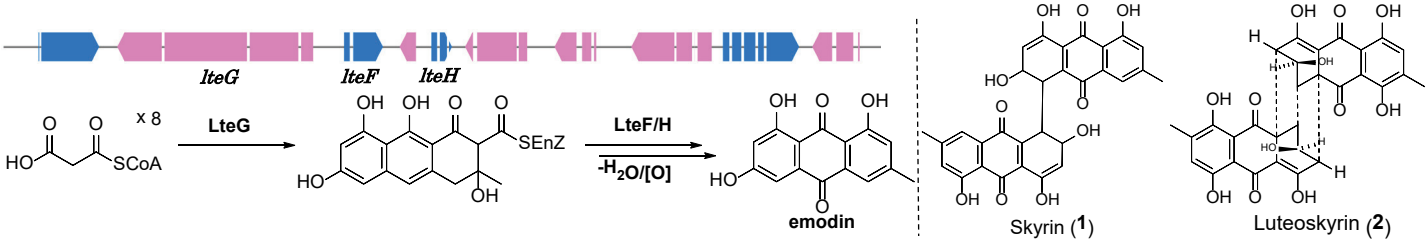
Functional analysis of enzyme genes involved in biosynthesis of filamentous fungus anthraquinone

○深谷 充功[1]、南 篤志[2]、尾﨑 太郎[2]、劉 成緯[2]、丸山 潤一[3]、及川 英秋[2]([1]北大理、[2]北大院理、[3]東大院農)

○Mitsunori FUKAYA[1], Atsushi MINAMI[2], Taro OZAKI[2], Chengwei LIU[2], Junichi MARUYAMA[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad.Sch. Agricultural and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【目的】アントラキノン系ポリケタイドは、抗腫瘍活性、抗菌活性、抗マラリア活性など多様な生物活性を示す生物活性天然物である。３環性のアントラセン骨格を基本骨格とするものの、酸化度や置換基の違いによりその構造多様性が創出されている。加えて、skyrin[1)] (1)や luteoskyrin[1)] (2)のように、２種のモノマーがアリール-アリール結合で連結したビアントラキノンも単離されている。我々はこの２量化反応に興味を持ち、アントラキノン系天然物の生合成研究を行っている。本研究では、麹菌異種発現系を用いた異種発現により、アントラキノン系ポリケタイドの生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析を行ったので、その詳細を報告する。

【方法・結果】*T. islandicus* は、1 や 2 などのビアントラキノンと各種モノマーを生産することが報告されている。実際に生産菌を CYA 培地で培養したところ、1 を含む複数の色素成分を観測することができた。次いで、公開データベースに登録されていたゲノム情報を基に BLAST 検索を行ったところ、骨格構築に関わると予想された non-reducing PKS、thioesterase、decarboxylase とチトクローム P450 などの修飾酵素遺伝子をもつ生合成遺伝子クラスターを見いだした。この生合成遺伝子の機能を解明するため、３種類の骨格構築酵素遺伝子をクローニングして発現用プラスミドを構築し、麹菌へと導入した。得られた３重形質転換体の代謝産物を UPLC-MS で分析したところ、emodin[2)]の生産を確認することができた。これより、本クラスターがアントラキノンの生合成に関与することが支持された。導入する遺伝子の組み合わせを変えた場合には生合成中間体と思われる複数の化合物が生産しており、現在、その解析を進めている。併せて、二量化に関わると予想される候補遺伝子を導入した形質転換体を用いた微生物変換の結果についても報告する。



ref.) 1) Bouhet, JC. *et al.*, J. Agric. Food Chem. **1976**. Vol. 24, No. 5. 964-972.

2) Buchalter, L. J. pharm. Sci. 1969. Vol. 58, 777-910.

heterologous expression, natural products, Aspergillus oryzae

発表責任者：深谷充功（mitsunorif@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A17 会場

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた糸状菌天然物の異種生産

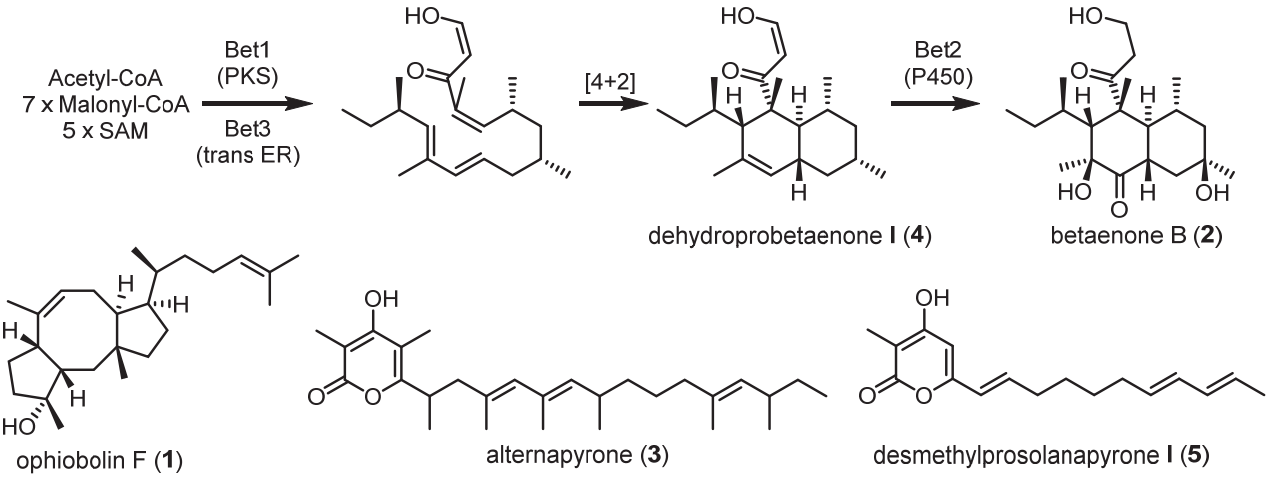
Heterologous production of fungal natural products by using genome editing technology CRISPR/Cas9

○佐藤 優哉[1]、瀧野 純矢[2]、椎名 哲也[2]、鵜飼 孝大[1]、南 篤志[3]、尾﨑 太郎[3]、劉 成緯[3]、藤井 勲[4]、丸山 潤一[5]、及川 英秋[3] ([1]北大院総化、[2]北大理、[3]北大院理、[4]岩手医科大薬、[5]東大院農)

○Yuya SATOH[1], Junya TAKINO[2], Tetsuya SHIINA[2], Takahiro UGAI[1], Atsushi MINAMI[3], Taro OZAKI[3], Chengwei LIU[3], Isao FUJII[4], Junichi MARUYAMA[5], Hideaki OIKAWA[3] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [4]Sch. Pharm., Iwate Med. Univ., [5]Grad. Sch. Agricultural and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景】麹菌異種発現系は、糸状菌に由来する天然物の異種生産に有効である。我々は、これまでにテルペノイドとして ophiobolin F (**1**)、ポリケタイドとして betaenone B (**2**)や alternapyrone (**3**)の生合成経路の解明と異種生産に成功してきた。一方で、サイズの大きい遺伝子や複数の遺伝子を導入する際には、望む酵素活性を有する形質転換体の選別に多大な労力と時間を要してきた。これは、非相同末端結合により麹菌のゲノム上のランダムな位置に標的遺伝子が導入されることに一因がある。そこで、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的な異種生産法の確立を目指した。

【実験手法と結果】我々が構築した betaenone B を生産する形質転換体（AO-*bet1/3/2*）を用いて CRISPR/Cas9 システムによる *bet2* の破壊を試みた。AO-*bet1/3/2* に *bet2* ノックアウト用プラスミドを導入したところ、*bet2* 破壊形質転換体では 1 塩基の欠損により **2** が生産せず、中間体である dehydroprobetaenone I (**4**)が蓄積した。次いで、アミラーゼ遺伝子プロモーター(PamyB)と **1** を生合成する遺伝子を連結した DNA 断片を調製し、*bet2* ノックアウト用プラスミドと共に AO-*bet1/3/2* に導入したところ、**1** を生産する形質転換体を 50%～70%の割合で取得した。同様の手法を用いることで、**3** や desmethylprosolanapyrone I (**5**)を生産する形質転換体を約 50%の割合で取得した。このことから、本手法を用いることで効率的な遺伝子導入が可能であることが示された。現在、機能未知遺伝子へと拡張しており、その詳細についても発表する予定である。



genome editing technology, natural products, heterologous expression

発表責任者：佐藤 優哉（syuya@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A17 会場

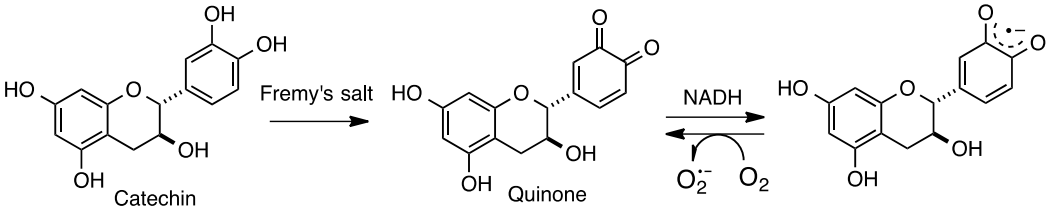
カテキンのプロオキシダント効果：キノン代謝を経由する活性酸素毒性の解析

Pro-oxidant effects of catechin through quinone metabolites

水野 美麗、阿部 眞優奈、生澤 瑞希、○福原 潔（昭和大薬）
Mirei MIZUNO, Mayuna ABE, Mizuki IKEZAWA, ○Kiyoshi FUKUHARA (Showa Univ.)

フラボノイド系抗酸化物質は酸化ストレス予防作用や抗動脈硬化、抗ウイルス作用等の多様な生理活性を有することから、生活習慣病の予防薬として注目されている。しかし、近年、カテキンによる肝機能障害が明らかとなり、カテキンを高濃度に含む緑茶抽出物の摂取による劇症肝炎の発症例が報告された。我々はカテキンの毒性について化学的な解析を行い、活性酸素の発生系であるフェントン反応を促進すること、また、塩基性条件下では酸素分子を還元してスーパーオキシドを発生することを明らかにしてきた。フラボノイド系抗酸化物質に特徴的なカテコール構造は、チロシナーゼ等によって容易にキノンへと酸化される。一般にキノンはタンパク質のチオールに代表される求核置換基と共有結合するとともに、還元条件下ではスーパーオキシドを発生して生体障害を引き起こす。しかしながら、カテキンのキノン酸化体を経由する毒性は、キノン構造が非常に不安定であることから詳細な検討は行われていない。本研究ではカテキンのキノンへの酸化代謝を伴う活性酸素毒性について化学的なモデル反応を用いて検討を行った。

カテキンの酸化代謝によるモデル反応として一電子酸化剤であるガルビノキシルラジカル（GO·）との反応を行った。反応生成物は非常に不安定で単離できなかったが、当量の GO·との反応溶液を NMR で解析したところ、カテキンとキノン酸化体の 1:1 混合物が得られた。この結果より、カテキンが一電子酸化されて生成するカテキンラジカルカチオンは、不均化反応によってキノンへと酸化されることがわかった。次にカテキンのキノン酸化体による DNA 損傷反応について検討を行った。カテキンの酸化反応を水溶性の一電子酸化剤である Fremy 塩を用いて行った後、pBR322DNA と NADH を添加して 1 hr インキュベーションした。反応溶液をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、DNA の切断が進行していることが確認された。本反応は活性酸素消去剤（DMSO）存在下では進行しないことから、DNA の切断反応はキノン酸化体を経由して発生する活性酸素によることがわかった。本反応系での活性酸素の発生は ESR 法によっても確認することができた。以上、カテキンが一電子酸化反応で生成するキノン酸化体は還元剤存在下で活性酸素を発生して DNA 切断を誘発することが明らかとなった。本結果はカテキン系抗酸化物質の毒性を評価する上での有用な知見となる。



catechin, pro-oxidant effects, toxicology

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：2A17p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A17 会場

昆虫におけるインドール酢酸生合成の機構に関する研究

Study on the mechanism of indole-3-acetic acid production in insects

○武井 麻美[1,2]、小暮 奨太[1]、横山 千晃[1]、上妻 由章[1]、鈴木 義人[1] ([1]茨城大・農、[2]東京農工大・連合農学)
○Mami TAKEI[1,2], Shota KOGURE[1], Chiaki YOKOYAMA[1], Yoshiaki KOUZUMA[1], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【目的】

昆虫の中には摂食や産卵により植物にゴールという異常な組織を形成する種が存在する。ゴール形成に関わる重要な因子としてインドール-3-酢酸（IAA）の関与が示唆されている。昆虫における主要な IAA 生合成経路は，トリプトファン（Trp）→インドール-3-アセトアルドキシム（IAOx）→インドール-3-アセトアルデヒド（IAAld）→IAA である。この経路はゴールを形成するハバチ，ゴールを形成しないカイコともに共通で，ゴール形成昆虫は進化的に IAA 生合成能を高めたと考えられる。また，カイコは Trp→IAOx の変換が律速段階となる一方で，ハバチではこの変換能が高められているため，Trp→IAOx の変換が昆虫における IAA 生合成の鍵となっていると考えられる。我々は昆虫における IAA 生合成酵素を明らかにすることで，ゴール形成昆虫がいかにして高い IAA 生合成能を獲得したのかを解明することを目的としている。

【結果・考察】

カイコ絹糸腺タンパク質をカラムクロマトグラフィーにより精製し，Trp または IAOx から各代謝物への変換活性を測定した。粗酵素液では Trp から中間体である IAOx や IAAld は蓄積せず，速やかに IAA まで代謝されていたが，分画後には Trp からの代謝物として中間体の蓄積が認められた。現在，さらに精製を進め，IAA 生合成酵素の同定を試みている。また，各前駆体の非酵素的な変換も認められ，これらが IAA の生産に部分的に関与している可能性についても検討している。

indole-3-acetic acid, gall, insect

講演番号：2A17p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A17 会場

原核生物由来テルペン合成酵素の探索と解析

Exploration and functional analysis of terpene synthases from prokaryotes.

○村井 恵一[1]、新家 一男[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物生産工学セ、[2]産総研)
○ Keiichi MURAI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Biotechnol. Res. Ctr.・UTokyo, [2]AIST)

【背景・目的】

これまでカビや細菌の Class I テルペン合成酵素は配列相同性によるゲノムマイニングが困難であり、その探索は植物を中心として進められてきた.しかし近年、隠れマルコフモデルを利用した手法により、原核生物由来の保存度の低いモチーフを対象にしてテルペン合成酵素が発掘可能であることが示された (Y. Yamada *et al*., *PNAS*, 2015, 112, 857). 本研究では、原核生物ゲノムデータベースよりテルペン合成酵素を探索し、新奇テルペン骨格の発掘を行うことと、それらの詳細な環化機構を明らかとすることを目的とした.

【結果】

産業技術総合研究所の原核生物ドラフトゲノムデータベースより取得した 1,242,605 種のアミノ酸配列に対して、Class Iテルペン合成酵素ドメイン（PF03936）による検索を行なった. ヒットした 341 種からさらに既報のバクテリア由来テルペン環化酵素と相同性を示さず、活性中心として知られているモチーフ（DDXXD, NSE, RY）を持つ 51 種を選抜した. 現在まで GPP、FPP、GGPP での *in vitro* 反応と GC-MS 分析により、30 種の可溶化酵素からテルペン合成活性を確認できた. 化合物ライブラリー検索の結果、Nerol、Linalool、α-Terpineol、Viridiflorol、Bicyclogermacrene、β-Elemene、α-Farnesene、*cis*-β-Farnesene、Farnesol、Bisabolene、Germacrene D-4-ol、α-Bergamotene、β-Barbatene をそれぞれメインに合成する酵素と推定された. Linalool、Germacrene D-4-ol を除き、全て細菌から報告例のない新奇テルペン合成酵素であった. また、ライブラリー検索により化合物がヒットせず新奇化合物と推定される 16 個のセスキテルペンと 3 個のジテルペンを見出した. この新奇化合物について構造解析を行なった結果、現在までに 5-4-5 員環の Spatane 骨格を持つジテルペン化合物 Spata-11(18),14-diene、および 5-5-6 員環を持つ新奇セスキテルペン化合物を同定した.発表では、この新奇化合物の推定反応機構についても報告する.

isoprenoid, cyclase, genome mining

発表責任者：村井恵一（kei.murai.n.s@gmail.com）

講演番号：2A17p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A17 会場

Trichoderma 属糸状菌由来 Brasilane 型セスキテルペン合成酵素の機能解析
Cloning and characterization of Brasilane-type sesquiterpene synthase from *Trichoderma*
○寺本 和矢[1]、野中 健一[2]、塩見 和朗[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]北里大・生命研)
○Kazuya TERAMOTO[1], Kenichi NONAKA[2], Kazuro SHIOMI[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]Kitasato Univ.)

【目的】
テルペノイドは数万種類以上が存在する最大の天然化合物群であり,多様な構造と生理活性を持つテルペノイドが報告されている。[1] それらの生合成過程の中で, テルペン合成酵素が担う骨格形成反応は単独の酵素反応によって複雑な多環式化合物を一挙に作り出すことから, テルペノイドにおける構造多様性を生み出す鍵反応と考えられる。現在までに様々な環状骨格をつくるテルペン合成酵素が報告されている一方で, 既知のテルペン合成酵素が作り出す骨格の多様性はこれまでに単離された化合物の骨格の多様性よりも乏しいことから, 天然には未だ発見さていない新奇テルペン合成酵素が存在すると推測される。そこで, ジテルペンである Wickerol を生産することが報告されている *T. atroviride* FKI-3849 株[2]において, 統計モデル (隠れマルコフモデル; HMM)を用いたテルペン合成酵素遺伝子のゲノムマイニングと機能解析を行うことで, 新奇テルペン環化酵素の探索を行った。
【方法・結果】
T. atroviride FKI-3849 株ドラフトゲノム配列中から, テルペン合成酵素遺伝子の探索を行った。機能解析されたテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作製した HMM を使用したモチーフ配列の探索を行い, 7 種のテルペン環化酵素と推定される ORF (TaTC1~7) を見出した。FKI-3849 の total RNA を用いてこれらの配列の cDNA クローニングを試み, また FKI-3849 株で発現が確認できなかったものについては糸状菌 *Aspergillus oryzae* M-2-3 に当該 gDNA 配列を導入した形質転換体から total RNA を調製し cDNA クローニングを行った。大腸菌に発現させた各組換え酵素を用いた *in vitro* での機能解析の結果, TaTC6 は farnesyl pyrophosphate を基質として brasilane 型骨格を持つセスキテルペンへと変換する酵素であることを明らかにした。Brasilane 型セスキテルペノイドは紅藻[3]や担子菌[4]から単離されているが, その生合成酵素の報告は初めてである。

【引用文献】
(1) Christianson, D. W. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (17), 11570–11648.
(2) Yamamoto, T.; Izumi, N.; Ui, H.; Sueki, A.; Masuma, R.; Nonaka, K.; Hirose, T.; Sunazuka, T.; Nagai, T.; Yamada, H.; Ōmura, S.; Shiomi, K. *Tetrahedron* **2012**, *68* (45), 9267–9271.
(3) Iliopoulou, D.; Vagias, C.; Galanakis, D.; Argyropoulos, D.; Roussis, V. *Org. Lett.* **2002**, *4* (19), 3263–3266.
(4) Hu, D. B.; Zhang, S.; He, J. B.; Dong, Z. J.; Li, Z. H.; Feng, T.; Liu, J. K. *Fitoterapia* **2015**, *104*, 50–54.

terpenoid, terpene synthase, genome mining

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A17 会場

大腸菌を宿主とした Ergothioneine の発酵生産

Heterologous and high production of ergothioneine in *Escherichia coli*

大澤 怜[1]、上出 倫敬[1]、○佐藤 康治[2]、河野 祐介[3]、大津 厳生[3]、大利 徹[2]（[1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]筑波大）
Ryo OSAWA[1], Tomoyuki KAMIDE[1], ○Yasuharu SATOH[2], Yusuke KAWANO[3], Iwao OHTSU[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Tsukuba Univ.)

【研究背景】

Ergothioneine（ERG）は含硫アミノ酸の一種で高い抗酸化活性を有する。ERG はヒトをはじめ多くの生物に存在するが、ヒトはその生合成経路を持たないが、ERG 特異的トランスポーター（OCTN1）で積極的に取込むことから、生命維持において重要な化合物と考えられている。現在、化粧品や健康補助食品用にキノコ抽出物が利用されているが含有量は低く、新たな供給法が望まれていた。しかし生合成遺伝子を含め、ERG 生合成経路の詳細は長らく不明であった。このような背景下、2010 年に ERG を生産することが知られている *Mycobacterium smegmatis* から 5 個の遺伝子からなる ERG 生合成遺伝子クラスター（*egtABCDE*）が取得、解析され ERG の生合成経路が明らかにされた（Seebeck, F.P. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6632–6633（2010））。そこで本研究では、*egt* 遺伝子と大腸菌を用いた発酵生産について検討した。

【方法・結果及び考察】

ERG の発酵生産には各生合成酵素の高発現が必須である。しかし、ERG 生合成中間体は入手困難であり、各酵素の活性を測定することは困難であったため、それらを可溶性に発現できる条件を確立し ERG の生産性を評価した。5 つの酵素のうち、EgtA は大腸菌も持つ γ-glutamylcysteine 合成酵素であるため、EgtB～E について各種プロモーターや可溶化のための融合タグを検討し、個々の酵素の高発現条件を確立した。

確立した条件下では 83 μM の ERG の生産性が得られた。その代謝産物を解析したところ、初発中間体である hercynine の著量の蓄積が認められた。したがって hercynine を基質に用いる EgtB が律速反応であり、もう一方の基質である γ-glutamylcysteine の供給不足が示唆された。そこで供給強化を種々試み、最終的に 104 μM の ERG 生産性を達成した。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の助成を受けて行われたものである。

ergothioneine, metabolic engineering, *Escherichia coli*

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A17 会場

多価不飽和脂肪酸合成酵素における 3-ケトアシルリダクターゼとデヒドラターゼの機能解析

Functional analysis of 3-ketoacyl reductase and dehydratase domains in polyunsaturated fatty acid synthases

○林 祥平[1]、佐藤 康治[2]、小笠原 泰志[2]、氏原 哲朗[3]、大利 徹[2] ([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]協和発酵バイオ)

○Shohei HAYASHI[1], Yasuharu SATOH[2], Yasushi OGASAWARA[2], Tetsuro UJIHARA[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kyowa Hakko Bio)

【研究背景】

ドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）に代表される多価不飽和脂肪酸(PUFA) は必須脂肪酸であり、健康増進効果も知られており、その需要は増加の一途を辿っている。従来の供給源は魚油等の海洋資源であるが、海洋資源の枯渇や安定供給が問題となっており、新規 PUFA 供給源として微生物発酵が期待されている。ある種の海洋性微細藻類や細菌は PUFA を脂肪酸合成酵素経路ではなく、ポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体(PUFA 合成酵素) により生合成することが知られている。しかし、巨大酵素であるため、組換え酵素を用いた *in vitro* 解析は困難であり、酵素の詳細な機能解析に関する報告は少ない。そこで、本研究では PUFA 合成酵素を構成する Ketoacyl reductase (KR) と Dehydratase (DH) ドメインを部分発現、精製し、*in vitro* 機能解析を試みた。

【方法・結果及び考察】

海洋性原核生物 *Photobacterium profundum* 由来 EPA 合成酵素のサブユニット A にある KR とサブユニット C にある DH のドメイン部分の組換え酵素を調製した。基質として acetoacetyl-*S*-*N*-acetyl cysteamine (acetoacetyl SNAC)、3-hydroxy-butyryl SNAC、crotonyl SNAC を合成した。それぞれの基質と対応する組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行い LC/MS で解析した。その結果、それぞれのドメイン機能に対応する生成物が認められ、各ドメインは単独で発現でき、予想した触媒機能を有していることが確認された。また、微細藻類 *Schizochytrium* 属由来 DHA 合成酵素についても同様に検証を行い、予想される触媒活性が認められた。現在、これらドメインの基質特異性について解析を行っている。

polyunsaturated fatty acid synthase, 3-ketoacyl reductase, dehydratase

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A17 会場

放線菌由来アルカロイド SB-203208 の生合成研究

Biosynthesis of actinomycetical alkaloid SB-203208

○淡川 孝義[1]、胡 志娟[1,2]、阿部 郁朗[1] ([1]東大薬、[2]浙江大海洋)
○Takayoshi AWAKAWA[1], Zhijuan Hu[1,2], Ikuro Abe[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Zhejiang Univ.)

放線菌 *Streptomyces sp.* 由来アルカロイド化合物 SB-203208 は isoleucyl-tRNA synthetase 阻害剤として単離された化合物である。本化合物は特徴的な 6-azaindene 骨格、スルホンアミド、メチルフェニルアラニル側鎖を含み、その生合成反応を詳細に解析することで、新規な酵素反応が見出されることが期待された。また、その類縁化合物 altemicidin は抗腫瘍活性を持つ化合物であるため、SB-203208 生合成を解析することで、医学薬学の見地において有用な化合物の生合成に繋げることができると期待される。しかし、生産菌と報告された菌体は生産培地においても SB-203208 を生産せず、その生合成遺伝子は発現していない休眠遺伝子であると考えられた。

生産菌のゲノムシーケンスを行い、そのシーケンス情報より、耐性遺伝子と考えられる isoleucyl tRNA synthetase 遺伝子(Orf-1)を含む生合成遺伝子クラスターを見出した。このクラスターは、14kb、5kb の二つのオペロンからなり、側鎖合成に関わるメチル基転移酵素ホモログを含むため、SB-203207 合成に関わる可能性が高いと考えられた。そこでこれら遺伝子を発現し、その生成物を取得するべく、異種発現実験を行った。in fusion 法、RED-ET 法を用いて 14kb のオペロンをクローニングし、放線菌発現ベクターを構築した。このベクターを *Streptomyces lividans* に導入し、培養した所、水溶性画分に新たな化合物が生産されたことが確認された。この化合物を大量調製し、NMR、HR-MS 分析を行った所、本化合物を altemicidin と同定した。また、5kb のオペロンを追加して発現することで、新たに複数の化合物が生成することを確認した。これらのうちの一つの *m/z* は、SB-203208 と一致したため、二つのオペロンの発現により、目的化合物が生成されたことが示唆された。

5kb のオペロンには、Orf1, Orf2 (AMP-ligase), Orf3 (mycothiol acetyltransferase)が存在し、これらがアミノ酸側鎖の転移に関わっていると考えられた。それぞれの酵素の in vitro 反応の結果、驚くべきことに、Orf1 は通常の酵素と異なり、altemicidin のスルホンアミドに isoleucyl 基の転移を行う生合成酵素であることが判明した。また、Orf2、Orf3 がキャリアープロテイン (Orf7)を介してメチルフェニルアラニル側鎖を転移する反応を触媒することを明らかにした。現在、これらの反応と共に、スルホンアミド、6-azaindene 生合成を含むいくつかの生合成経路を探索するために、ラベル体投与、遺伝子破壊実験を行なっている。

1) Houge-Frydrych C. S. V. *et al. The Journal of Antibiotics* **2000**, *53*, 364.

Actinomycete, alkaloid, biosynthesis

発表責任者：淡川孝義（awakawa@mol.f.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A17 会場

ペプチジルヌクレオシド系抗生物質 Amipurimycin の生合成に関する研究
Studies on the Biosynthesis of the Peptidyl Nucleoside Antibiotic Amipurimycin

○池内 秀雄[1]、白石 太郎[1]、新家 一男[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○ Hideo IKEUCHI[1], Taro SHIRAISHI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST)

【背景・目的】

Amipurimycin (APM) はニューギニア土壌サンプルから単離された *Streptomyces novoguineensis* 株の培養液中から発見されたペプチジルヌクレオシド系抗生物質である[1,2]。APM はイモチ病の病原菌である *Pyricularia oryzae* の生育を特異的に阻害するため[1]、新規農薬として開発できる可能性がある。APM は 2-aminopurine、cispentacin、1,2-dihydroxyethyl 基を側鎖に持つ糖など特徴的な構造を有しているが、生合成に関する報告はなかった。そこで本研究では APM の生合成経路の全容を解明することで、新規酵素の発見や創薬に繋がる知見を得ることを目的としている。我々はこれまでに遺伝子破壊および異種発現実験により、APM 生産菌 *Streptomyces* sp. C-1 株から APM 生合成遺伝子クラスターの同定に成功している。この遺伝子クラスターの *in silico* 解析を行ったが、2-aminopurine および糖構造の生合成経路の予測は困難であった。また、C-1 株の APM 生産量は少なく、^{13}C 標識した前駆体を用いたトレーサー実験を行うには生産量を向上させる必要があった。

【方法と結果】

生産量を向上させるために、APM 生合成遺伝子クラスター内に存在する SARP 遺伝子である *orf68* の高発現株を作製した。*orf68* 高発現 C-1 株培養液を LC-MS で解析した結果、*orf68* 高発現 C-1 株は C-1 株に比べ約 30 倍程度 APM を高生産していた。そこで、この形質転換株を用いて ^{13}C 標識した前駆体を用いたトレーサー実験を行った。また、生合成経路を予測するために遺伝子破壊株を作製し、代謝物の解析を行った。これらの詳細な結果について報告する。

【文献】

1) Iwasa, T., *et al*., *J Antibiot*, **30**, 1-10 (1977)
2) Harada, S. and T. Kishi, *J Antibiot*, **30**, 11-6 (1977)

Streptomyces, biosynthesis, natural product

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A17 会場

新規 thioviridamide 類縁体の創出と生合成酵素の機能解析
Designing of new thioviridamide analogs and characterization of the biosynthetic enzymes
○工藤 慧[1]、小岩井 花恵[3]、新家 一男[2]、池田 治生[3]、西山 真[1]、葛山 智久[1]([1]東大・生物工学セ、[2]産総研、[3]北里大・北里生命研)
○Kei KUDO[1], Hanae KOIWAI[3], Kazuo SHIN-YA[2], Haruo IKEDA[3], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST, [3]Kitasato Inst. for Life Sci., Kitasato Univ.)

アミド結合の酸素原子が硫黄原子に置き換わったチオアミド結合は、報告例が少ないながらも天然化合物中にもみられる構造である。チオアミド結合はアミド結合と比べて生物活性の向上や、薬物動態の向上が見込まれ、薬剤開発においても注目すべき官能基の一つといえる。

天然チオアミド化合物の例としては、thiouridine や ergothioneine の他に、thioviridamide (TVA)(1)(2)や thiopeptin、closthioamide などの二次代謝産物が知られている。我々はこれまでに、*Streptomyces olivoviridis* OM13 株から TVA の構造類縁体である JBIR-140 の生合成遺伝子クラスターをクローニングし、*S. avermitilis* SUKA 株を用いた異種発現系の構築に成功している (3)。JBIR-140 は RiPPs (Ribosomally translated and post-translationally modified peptides)の一種であるため、プレカーサーペプチドのアミノ酸置換変異を新たな方法論によって導入することで、新規骨格を有するチオアミド化合物を醗酵生産できると考えた。28 種類以上のアミノ酸置換変異を導入した JBIR-140 遺伝子クラスターを *S. avermitilis* SUKA 株に導入したところ、80 %程度の形質転換体で新規骨格を有する TVA 類縁体が生産された。うち 6 株の培養液から 8 化合物を精製し、細胞毒性活性を検討した。これらの化合物には JBIR-140 とは修飾の異なるものが含まれており、それらの構造活性相関についても議論する。

さらに、JBIR-140 生合成遺伝子クラスターの各遺伝子の破壊株を作製した。9 株中 5 株で生産が失われたものの、残り 4 株では JBIR-140 またはその修飾が失われた類縁体が生産された。これを基に生合成経路を推定し、いくつかの生合成酵素について組換えタンパク質を用いた *in vitro* 機能解析を行った。JBIR-140 生合成遺伝子クラスター中には aminovinylcysteine 構造とチオアミド構造の生合成遺伝子が含まれ、RiPPs 生合成に関する新たな知見を得ることができたので報告する。

1) Y. Hayakawa, et al., *J. Antibiot.* 59: 1-5, 2006
2) M. Izawa, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 7110-3, 2013
3) M. Izumikawa, et al., *J. Antibiot.* 68: 533-6, 2015

thioviridamide, bioassay, biosynthesis

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A17 会場

streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の基質特異性解析
Substrate specificity of an aminoacyl-tRNA-dependent amide bond synthase involved in the biosynthesis of a streptothricin-related compound

○松田 貫暉[1]、丸山 千登勢[1]、後藤 佑樹[2]、橋本 順子[3]、新家 一男[4]、菅 裕明[2]、濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]東大院・理、[3]JBIC、[4]産総研)
○ Kanki MATSUDA[1], Chitose MARUYAMA[1], Yuki GOTO[2], Junko HASHIMOTO[3], Kazuo SHIN-YA[4], Hiroaki SUGA[2], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Tokyo Univ., [3]JBIC, [4]AIST)

【目的】streptothricin (ST) 類縁化合物である抗生物質 BD-12 の生合成において、アミノ糖と glycine のアミド結合形成は、FemXA family に相同性を示す Orf11 によって Gly-tRNA^{Gly} 依存的に触媒される[1]。当研究室はこれまでに、Orf11 ホモログ酵素である Sba18 を同定しており、本酵素は、Gly-tRNA^{Gly} だけでなく、Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質として認識した。この結果より、Sba18 は aa-tRNA^{aa} 上の aminoacyl 基および tRNA^{aa} の両方に対して、基質特異性の広い酵素であることが判明した。そこで、本研究では、tRNA^{aa} の 3′末端に様々な acyl 基を結合できる人工 RNA 触媒 flexizyme を用いて、tRNA^{aa} および aminoacyl 基に対する Sba18 の基質特異性について検証した。

【方法と結果】Sba18 の tRNA^{aa} に対する基質特異性を調べるために、*in vitro* 転写反応にて、tRNA^{Gly} および tRNA^{Ala}、tRNA^{Ser}、tRNA^{Lys} を合成した。これら tRNA^{aa} を flexizyme によって Gly-tRNA^{Gly}、Gly-tRNA^{Ala}、 Gly-tRNA^{Ser}、Gly-tRNA^{Lys} へと aminoacyl 化した後、これらを基質とした Sba18 の酵素反応を行った。その結果、いずれの Gly-tRNA^{aa} も基質として認識できることがわかった。したがって、Sba18 は tRNA^{aa} に対して、幅広い基質特異性を有することが明らかになった。次に、aminoacyl 基に対する基質特異性を調べるために、Sba18 の本来の基質と考えられる tRNA^{Gly} に多様なアミノ酸を aminoacyl 化し、Sba18 の酵素反応基質として用いた。flexizyme を用いて Gly-tRNA^{Gly}、Ala-tRNA^{Gly}、Ser-tRNA^{Gly}、Lys-tRNA^{Gly} を合成し、Sba18 の酵素反応を行ったところ、Gly-tRNA^{Gly}、Ala-tRNA^{Gly}、Ser-tRNA^{Gly} は基質として認識する一方で、Lys-tRNA^{Gly} は基質として認識しないことが判明した。この結果より、Sba18 が基質として認識できる aminoacyl 基の側鎖構造の鎖長には制限があることが示唆された。現在、Sba18 が認識することができる側鎖構造の多様性について検証している。さらに、本酵素の幅広い基質特異性を利用した、ST 類化合物の多様性創出も試みており、その結果についても紹介する。

[1] C. Maruyama *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016

tRNA, amide bond, flexizyme

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2A17p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A17 会場

抗生物質 SF-2111B における *O*-acylpeptide 生合成遺伝子の機能解析
Functional analysis of the *O*-acylpeptide biosynthetic genes in an antibiotic SF-2111B
○新倉 春香[1]、丸山 千登勢[1]、坂上 莉奈[1]、橋本 絢子[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大院・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○Haruka NIIKURA[1], Chitose MARUYAMA[1], Rina SAKAGAMI[1], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【目的】抗生物質 BD-12 類縁化合物である SF-2111B は、serine、methylmalonate、alanine からなる特徴的な *O*-acylpeptide 構造を有しており、この構造が抗真菌活性に重要であることが知られている[1]。本構造の生合成機構を明らかにするために、BD-12 生合成遺伝子群を指標に、SF-2111B 生産菌のゲノム情報から生合成遺伝子群を探索したところ、ホモログ生合成遺伝子群 *sbb* クラスターを見出し、本クラスターが SF-2111B の生合成に関与していることが示唆された。さらに放線菌ゲノムデータベースから、*Streptomyces prunicolor* NRRL B-12281 にも *sbb* クラスターに高い相同性を示す *sbc* クラスターを有していることを見出した。これまで、*sbc* クラスターを含む BAC クローンを異種放線菌に導入し、得られた形質転換体が SF-2111B を生産することを確認している。*sbc* クラスター中には、BD-12 類縁化合物の共通骨格の生合成遺伝子に相同性のない 4 つの遺伝子（*orf1195*、*orf1196*、*orf1197*、*orf1198*）が存在することから、我々はこれらの遺伝子に着目し、研究を進めてきた。SAM hydroxide adenosyltransferase 遺伝子 *orf1195* の破壊実験や非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子である Orf1197 及び Orf1198 の組換酵素を用いた実験結果から、これら 3 つの酵素遺伝子は *O*-acylpeptide 構造の生合成に関与することを明らかにしている。そこで、その近傍に位置する *orf1196* についても *O*-acylpeptide 構造の生合成に関与すると考え、本遺伝子の解析を行った。
【方法と結果】BLAST 検索の結果、Orf1196 は asparagine synthase に相同性を示すことが示唆された。そこで、*orf1196* 遺伝子を in-flame で破壊した *sbc* クラスターを作製し、異種放線菌に導入した。得られた形質転換体の培養上清を LC/MS にて分析した結果、*O*-acylpeptide 構造中の alanine 残基を欠失した新規 SF-2111B 類縁化合物と考えられる *m/z* 647 を示す化合物の生産を観察した。したがって *orf*1196 は、methylmalonate と alanine のアミド結合を触媒することが示唆された。現在、本化合物を単離精製し、NMR による構造解析を進めているが、本化合物は新規 SF-2111B 類縁化合物であるため、本化合物の生理活性についても検証している。本発表ではこれらの結果について報告する。

【文献】
1. Kondo, Y. *et al*., *Meiji Seika Kenkyu Nenpo*., 24, 16-26 (1985).

peptide, asparagine synthase, biosynthesis

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2A17p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A17 会場

環状ペプチド化合物 Q6402 における methyl-cyclopropane 環生合成機構

Biosynthetic mechanism of the methyl-cyclopropane ring formation in a cyclic peptide Q6402

○茅根 千湖[1]、丸山 千登勢[1]、橋本 絢子[2]、小曽根 郁子[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○Yukiko CHINONE[1], Chitose MARUYAMA[1], Junko HASHIMOTO[2], Ikuko KOZONE[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【目的】放線菌によって生産される Q6402 は、Thr、Phe、Glu、hydroxy-Trp、hydroxy-phenylglycine、2-methyl-1-aminocyclopropanecarboxylic acid（methyl-ACC） の 6 残基のアミノ酸からなる環状オリゴペプチド構造を有し、抗炎症作用を持つ生理活性物質である。本化合物は特徴的な methyl-ACC 構造を有しており、その生合成機構には大変興味が持たれた。これまで既に Q6402 生合成遺伝子群が同定されており、放線菌を宿主とした異種発現株による生産性も確認している。しかし、遺伝子群の機能推定からは、methyl-ACC 生合成を触媒する酵素遺伝子の同定には至らなかった。そこで本研究では、methyl-ACC 生合成に関わる遺伝子群の同定および機能解析による生合成経路の解明を目的とした。

【方法と結果】ACC は植物ホルモンの 1 種である ethylene の生合成前駆体であり、*S*-adenosylmethionine（SAM）から PLP 依存型 ACC synthase の触媒によって生合成される[1]。また大腸菌が生産する colibactin 生合成においても、ACC が SAM を基質として非リボソーム型ペプチド合成酵素の関与によって生合成されることが報告されている[2]。しかしこれらに相同性を示す酵素遺伝子は Q6402 生合成遺伝子群には存在せず、新規 ACC 合成酵素遺伝子の存在が予想された。そこでまず、Q6402 の methyl-ACC が SAM から生合成されるかを調べるために、[1-^{13}C]-L-methionine 及び[methyl-^{13}C]-L-methionine の添加培養を行い、培養上清を LC-TOF-MS にて分析した。その結果、生産された Q6402 に分子量増加が観察されたことから、L-methionine もしくは SAM 由来の炭素骨格を有することが示唆された。そこで PLP や SAM の結合ドメインを有する酵素遺伝子を探索したところ、*orf2399* と *orf2400* がそれぞれ、ラジカル SAM 結合ドメインを有する酵素と PLP 依存型 aminotransferase に相同性を示すことを見出した。これらの酵素遺伝子が methyl-ACC 生合成にどのように関与しているのかを調べるために、それぞれの酵素遺伝子を in-frame で破壊したところ、両破壊株において Q6402 生産性が完全に消失した。このことから、先に methyl-ACC が生合成され、環状オリゴペプチド構造に取り込まれる生合成経路が示唆された。現在、各[^{13}C]-methionine 取込み部位の同定およびこれら酵素遺伝子の機能解析を行っており、その詳細について紹介する。

【文献】

1. S.H. K. *et al., Archives of Biochemistry and Biophysics.,* 412, 85-90 (2004).
2. L. Zha *et al., Nat. Chem. Biol.,* 13, 1063-1065 (2017).

cyclopropane, *S*-adenosylmethionine, biosynthesis

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2A17p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A17 会場

ficellomycin 生合成におけるアザビシクロ環の修飾機構に関する研究

Study on the mechanism for modification of 1-azabicyclo[3,1,0]hexane ring in ficellomycin

○黒澤 菫、松田 研一、長谷部 文人、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Sumire KUROSAWA, Kenichi MATSUDA, Fumihito HASEBE, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, UTokyo)

我々はこれまでに 1-azabicyclo[3,1,0]hexane ring（以降、アザビシクロ環）を含む新規の非タンパク性アミノ酸 (Aza) を含むジペプチド vazabitide A の生合成について研究を行い、アザビシクロ環の形成にアミノ基と結合する新規キャリアタンパク質 AmCP が関与していることを明らかにした。アザビシクロ環構造は DNA アルキル化の活性本体として働くことが報告されているが、vazabitide A は生物活性を示さない。一方で、vazabitide A のアザビシクロ環にグアニジル基が付加した類似化合物 ficellomycin は抗菌活性を示す。このことから、アザビシクロ環そのものに加え、修飾基が活性発現に重要であることが示唆された。したがって、アザビシクロ環修飾機構の解明は、アザビシクロ環含有化合物の構造及び生物活性の多様性を拡張する上で重要な知見をもたらすことが期待される。本研究では、アザビシクロ環含有化合物の生合成遺伝子クラスターの比較から、グアニジル基の形成に関わる遺伝子群を予想し、その形成機構の解明を目指した。

ficellomycin 生産菌 *Streptomyces ficellus* JCM4946 のドラフトゲノム配列を決定したところ、AmCP をコードする遺伝子が見出され、その周辺領域を ficellomycin 生合成遺伝子クラスターと予想した。同クラスターを *fic* クラスターと命名し、*in silico* 解析を行った。結果、vazabitide A 生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子が多く見出されたことから、ficellomycin も vazabitide A と同様に AmCP を介した類似の機構で生合成されると考えられた。一方で、*fic* クラスター中に特異的に存在する *fic16*、*fic18*、*fic19* を見出した。これらがグアニジル基の生合成に関与すると予想し、*fic18* と *fic19* の遺伝子破壊株を作製した。代謝物を LC-MS によって分析した結果、ficellomycin の生産は消失した。加えて、グアニジル基を有する中間体であると予想される *m/z* 214 を示す化合物の生産も消失した。これらの結果は、*fic18* と *fic19* がグアニジル基の形成に関与することを示唆している。現在 *fic18* と *fic19* の遺伝子破壊株で蓄積する新規化合物の同定を進めており、本発表では Fic18、Fic19 の *in vitro* の酵素活性を合わせて報告する予定である。

biosynthesis, natural product, amino group carrier protein

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A17 会場

Studies on Secondary Metabolic Pathway Mediated by Type II Amino-group Carrier Protein in *Streptomyces* sp.

○Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi Matsuda[1], Takeo Tomita[1], Kazuo Shin-ya[2], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] ([1]BRC UTokyo, [2]AIST)

Amino-group carrier protein (AmCP) is a novel carrier protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* sp. In *Streptomyces* sp. SANK 60404, novel non-proteinogenic amino acid named DADH ((2S,6R)-diamino-(5R,7)- dihydroxy-heptanoic acid) is produced by AmCP gene cluster. DADH is then utilized as an important intermediate to produce various unique non-proteinogenic amino acids and peptide compounds. Our previous studies on the mechanism of AmCP revealed the importance of the C-terminal glutamate residue in direct attachment of the substrate for proceeding of the biosynthesis. On the other hand, through *in silico* genome studies, we discovered that some *Streptomyces* sp. possess AmCP homologs in which the C-terminal glutamate residue was replaced with glutamine. Moreover, in those strains, their AmCP gene clusters lack several genes necessary for the DADH biosynthesis. Therefore we named this new type of AmCP type II AmCP. Type II AmCP gene is contained in highly conserved gene cluster consisting of 16 genes. In the annual meeting of JSBBA in 2017, we reported analysis of the gene cluster of *Streptomyces* sp. SpE090715-01. The gene cluster is involved in biosynthesis of a compound (compound A) with *m/z* 170.0465 [(M-H)$^-$] with the chemical formula of $C_7H_9NO_4$. NMR spectrum analysis revealed that the structure was similar to that of maleimycin, a bicyclic maleimide antibiotic discovered in 1973. We also showed that the first step of type II AmCP-mediated biosynthetic pathway is the activation of the AmCP through the conversion of the C-terminal glutamine into glutamate by Orf12, a glutamate amidotransferase homolog. Vzb23 homolog (Orf9) then ligates AmCP (Q61E) with glutamate. In the present study, in order to further identify the biosynthetic pathway, we performed gene knockout experiment and tried to detect the possible intermediate accumulated.

The gene knockout of *orf7* (α-isopropylmalate synthase homolog) abolished the production of compound A, demonstrating that *orf7* is responsible for the biosynthesis of compound A. Furthermore, the gene knockout resulted in the production of glutamate semialdehyde conjugated with the AmCP. These results suggested that Orf7 is involved in the conversion of the glutamate semialdehyde moiety to some other in an AmCP-conjugate form. On the other hand, gene knockout of *orf15* (aminotransferase homolog) and *orf16* (dehydratase homolog) accumulated structure-unknown compounds with *m/z* 171.026 [(M-H)$^-$] and 172.063 [(M-H)$^-$], respectively in culture medium. Considering that biosynthesis can be divided into two stages: one on AmCP and the other after release of biosynthetic intermediate from the AmCP, we assume that Orf15 and Orf16 catalyze the modification reaction of intermediate compounds in the second stage. In order to elucidate the biosynthetic pathway more precisely, we are now in progress in identifying other possible intermediate compounds accumulated in many knockout mutants. We will also conduct *in vitro* reaction for several enzymes.

type II AmCP, carrier protein, Streptomyces sp.

発表責任者：Makoto Nishiyama（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A17 会場

新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索
Isolation and structural elucidation of futalosine pathway inhibitors
○清水 庸平、佐藤 洋平、小笠原 泰志、大利 徹（北大院工）
○Yohei SHIMIZU, Yohei SATO, Yasushi OGASAWARA, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

【研究背景】

メナキノンは人間にとっては血液凝固に必須なビタミン（ビタミンK）であり、また微生物では電子伝達系の補酵素として生育に必須な物質である。その生合成については、大腸菌や枯草菌においてコリスミ酸から*o*-スクシニル安息香酸を経る経路が既に明らかにされていた。これに対し、当研究室では、胃がんの原因として知られているピロリ菌を含む一部の微生物に既知経路とは異なる全く新規なメナキノン生合成経路（フタロシン経路）を見出している。乳酸菌などの有用腸内細菌はメナキノンを既知経路で生合成することから、フタロシン経路の特異的阻害剤はピロリ菌に選択的に働く抗生物質になると期待される。本研究では放線菌や糸状菌の培養液からフタロシン経路阻害剤の探索を行い、候補化合物の単離および構造決定を行った。

【方法・結果及び考察】

阻害剤のスクリーニングにあたって、当研究室ではピロリ菌を扱うことができない。そこで互いに近縁の 2 種のバチルス属細菌を用いてフタロシン経路阻害剤のスクリーニングを行った。*Bacillus subtilis*は既知経路でメナキノンを生合成するのに対して、*Bacillus halodurans*はフタロシン経路でメナキノンを生合成する。そこで両菌株を被検菌に阻止円検定を用い、*B. subtilis*の生育を阻害せず、*B. halodurans*にのみに生育阻害活性を示すサンプルを探索し、複数の候補サンプルを得た。さらにメナキノン添加により生育阻害が回復することを指標に、実際にフタロシン経路を阻害するサンプルを絞り込んだ。得られたサンプルの内、活性が強かった放線菌の培養液を2つ選抜し、活性本体を溶媒抽出と各種クロマトグラフィーで単離・精製、構造解析を進めたので報告する。

本研究の一部は、浦上食品・食文化振興財団からの助成を受けて実施しました。

menaquinone biosynthesis, inhibitor, futalosine pathway

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A17 会場

ポリグルタミン酸生合成の解析

Biosynthesis of gamma-polyglutamic acid

重松 真由子、○小笠原 泰志、大利 徹（北大院工）
Mayuko SHIGEMATSU, ○Yasushi OGASAWARA, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

【研究背景】

一般に生体を構成するアミノ酸は L 体であるが、細菌や動植物を問わず D-アミノ酸が広く分布していることも明らかになっている。例えば細菌の細胞壁であるペプチドグリカンには D-アラニンがその構成成分として含まれている。また納豆が生産するγ-ポリグルタミン酸（γPGA)は、グルタミン酸がガンマ結合した高分子であるが、L 体と D 体のグルタミン酸（Glu）の両方が含まれている。この他、ペプチド二次代謝産物のペニシリンやポリセオナミドなどにもその構成アミノ酸として D-アミノ酸が含まれている。D-アミノ酸含有ペプチドの生合成では、多くの場合、アミノ酸ラセマーゼや非リボソームペプチド合成酵素のエピメラーゼドメイン等により D-アミノ酸が生成し、その後にペプチド結合の形成が起こる。これに対して、通常の L-アミノ酸からなるペプチドが生成した後にD体に変換される例は、ポリセナミド生合成におけるラジカル *S*-アデノシルメチオニン酵素による異性化や、最近当研究室で見出したペプチドグリカン生合成における新規ペプチドエピメラーゼなど少数のみが知られている。最近我々は、γPGA の生合成においても D-Glu が L-Glu からペプチド上の異性化反応により生成する可能性を見出したので、安定同位体を用いた投与実験によりその検証を行った。

【方法・結果及び考察】

納豆菌を含むバチルス属細菌によるγPGA の生合成に関しては、これまで *pgs* オペロンにコードされた 3 つの酵素（PgsBCA）の関与が示されているが、何れも膜酵素であり *in vitro* での反応解析がほとんどなされておらず詳細は未解明である。我々はグルタミン酸ラセマーゼ（MurI）欠損に由来する D-Glu 要求大腸菌（WM335 株）を用いてγPGA の異種宿主生産を行い、L 体または D 体の一方のみを同位体標識した Glu の投与実験によりγPGA の生合成解析を行った。本菌では Glu のラセミ化は起こらないため、ペプチド上での Glu 異性化が起こった場合のみ DL 間で標識体と非標識体の相互交換が起こる。重水素化 Glu の投与実験及び、得られたγPGA の LC-MS を用いた同位体解析の結果について発表する。

polyglutamic acid, biosynthesis, feeding experiment

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A17p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A17 会場

新規 labionen 構造の形成に関与する lanthipeptide 合成酵素の解析
Analysis of lanthipeptide biosynthetic enzymes responsible for formation of novel labionen structure
○菅井 佳宣[1]、江畑 一真[1]、浅水 俊平[1]、後藤 佑樹[2]、菅 裕明[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]東大院理)
○Yoshinori SUGAI[1], Kazuma Ebata[1], Shumpei Asamizu[1], Yuki Goto[2], Hiroaki Suga[2], Hiroyasu Onaka[1] ([1]Univ. of Tokyo (Agri. life Sci.), [2]Univ. of Tokyo (Sci.))

【背景・目的】リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) は広範な構造多様性を持つ巨大な天然化合物群の一つである。この中には強力な生理活性を示すものも多く含まれ、有用な医薬探索源とされている。*Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノム中には RiPPs の一種である lanthipeptide の生合成酵素遺伝子 (*lbeKC*) がコードされており、塩基配列情報から labionin 環 (Lab) 構造を形成する修飾反応に関与することが予想された。その近傍には aminovinyl-cysteine (AviCys) の生合成に関与する酸化的脱炭酸酵素遺伝子 (*lbeD*) が存在していた。これまでにこのような酸化的脱炭酸酵素と単環性の lanthionin (Lan) 合成酵素との組み合わせで生合成される化合物は知られていたが、二環性の Lab 合成酵素との組み合わせは報告が無いため、これら酵素の機能に興味が持たれた。本研究ではこの新規ペプチド化合物の生合成経路を解析し、特異な分子構造の生合成機構の解明を目的とした。
【方法】既に確立していた目的生合成遺伝子クラスターの異種発現系を用いて化合物の生産を行った。培養抽出物から目的ペプチドを単離、精製し各種機器分析により構造の決定を行った。RiPPs の修飾反応に関与すると予想された２つの遺伝子はそれぞれ大腸菌を用いて組換え酵素として調製した。*In vitro* 翻訳系を用いて前駆体ペプチドやアミノ酸残基を置換したアナログペプチドを調製し、これを基質に酵素反応を行なった。反応生成物は MALDI-TOF-MS で解析し、脱水、酸化的脱炭酸反応の進行を確認した。また、脱水反応によって形成される dehydroalanine 残基の二重結合は環化反応により消失するため、これを誘導体化して検出することで環化反応の進行を確認した。
【結果・考察】異種発現系を用いて生産したペプチド化合物を機器分析したところ、8 アミノ酸残基からなる環状ペプチドであった。さらに Lab 構造内の Lan が AviCys となった新規構造であることが示されたため、この構造を labionen (Lbe) と命名した。組換え酵素を用いた解析から、LbeD の反応により酸化的脱炭酸反応が進行し、そこに LbeKC を加えることにより３回の脱水反応が進行したことが示された。この反応生成物の環化状態を解析したところ、二環性の構造 (Lbe) が形成されていた。一方で、前駆体ペプチドに LbeKC のみを反応させたところ３回の脱水反応は進行したが、生成物は単環性の Lan 構造だった。前駆体ペプチドのアミノ酸配列から、Lan 構造は大きな環と小さな環を形成する可能性があったため、アミノ酸残基を置換したアナログペプチドを用いて解析した。その結果、いずれのサイズの Lan 構造も形成されうる事が示された。以上の結果から、LbeD との連続反応により LbeKC の酵素反応が単環性の Lan 形成から二環性の Lab 形成様へとスイッチすることが示された。

RiPPs, Lanthipeptide, Biosynthesis

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A18a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A18 会場

白きょう病菌(*Beauveria bassiana*)由来の生理活性物質の探索

Search for bioactive compounds from *Beauveria bassiana*

○碓井 梓美[1]、呉 静[2]、道羅 英夫[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)

○Azumi USUI[1], Jing WU[2], Hideo DOHRA[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirohumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）はバッカクキン科 *Beauveria* 属の昆虫病原性真菌で、害虫を防除するための生物学的殺虫剤として広く使用されている[1)]。カイコ（*Bombys mori*）に分生子を注入した実験では、*B. bassiana* の NMRC 103747 株は子実体を形成せず、我々が分離した No.1 株は子実体を形成した。両菌の分生子を同量注入した場合は子実体を形成しなかった。このことより、*B. bassiana* が産生する生物活性物質が子実体形成に影響を与えた可能性が示唆された。

そのため、本研究では *B. bassiana* の子実体、菌糸体および培養ろ液由来の子実体形成物質および他の生理活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

B. bassiana の No.1 株を 2 ヶ月、玄米+乾燥蛹培地で培養することにより得られた子実体を凍結乾燥し、ミキサーにより粉末状にした。乾燥粉末をヘキサン、酢酸エチル、メタノールおよび水で順次抽出した。このうちメタノール可溶部を HPLC によって分画し、化合物の単離を試みている。

また、*B. bassiana* の NBRC 103747 株を 1 週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養し、得られた培養液をろ過し、菌糸体及び培養ろ液に分けた。菌糸体は凍結乾燥後に粉砕し、ヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水を用いて、順次抽出した。培養ろ液は減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチルを用いて順次液-液分配し、減圧濃縮後、エタノールおよび水を用いて順次固-液分配した。菌糸体のエタノール可溶部および培養ろ液の酢酸エチル可溶部を、分取 TLC および HPLC によって分画し、現在、化合物の単離を試みている。単離した化合物は NMR や MS などの各種機器分析により、構造解析を行う。また、単離した化合物を用いて各種活性試験を行う一方で、更なる化合物の探索を行っている。

1）Samish, M.; Ginsberg, H.; Glazer, I. Parasitology, **129**, S389-403 (2004)

Beauveria bassiana, bioactive compounds, structural determination

講演番号：2A18a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A18 会場

オオシロカラカサタケ由来の機能性物質の探索
Search for functional compounds from *Chlorophyllum molybdites*
○大浦 健[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○Takeru OURA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】
オオシロカラカサタケ(*Chlorophyllum molybdites*)はハラタケ科オオシロカラカサタケ属に属する熱帯から亜熱帯に分布しているキノコであるが、温暖化の影響のためか最近は東海地方でも自生が確認されている。強い毒性を持つことが知られており、食べると嘔吐、下痢、腹痛などの消化器系の中毒症状がでる毒キノコである。このキノコに含まれる有毒成分として、モリブドフィリシン（マウス致死性毒）、ステロイド類（細胞毒）などが報告されている[1)]。昨年度の本大会では培養ろ液由来の化合物を単離したことを報告した[2)]。そこで、本研究ではオオシロカラカサタケの子実体, 培養菌糸体、培養ろ液由来の新規機能性物質の更なる探索を目的とした。

【方法・結果】
１）菌糸体
オオシロカラカサタケを30日間、ポテトデキストロース培地中で液体培養し、得られた培養液をろ過し、菌糸体及び培養ろ液に分けた。菌糸体をヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次抽出した。ヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。現在、NMRスペクトルやMSなどの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。
２）培養ろ液
培養ろ液を分液ロートを用いてヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次液-液分配した。酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。現在、NMRスペクトルやMSなどの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。
３）子実体
オオシロカラカサタケ子実体をエタノール、アセトンで順次抽出し、抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出した。現在、酢酸エチル可溶部及びエタノール可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。現在、NMRスペクトルやMSなどの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。

1）大杉晃一ら『おいしいきのこ毒きのこハンディ図鑑』p. 102　主婦の友社　(2010)
2）大浦ら、平成 29 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p. 1188

Chlorophyllum molybdites, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A18a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A18 会場

Isolation of Biologically Functional Compounds from *Tricholoma matsutake*

○Lisa FAHRUNNISSA[1], Kazuki UCHIDA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

[Background]

Tricholomamatsutake is a highly–prized wild edible mushroom growing at the bottom of pine trees. Particularly in Japan, matsutake is known as a delicious but very expensive mushroom, and appreciated as reputed medicinal and anticarcinogenic properties[1)]. Isolation of a polysaccharide extract possessing antitumor, radiation–resistant, and anti–aging activity was reported in the previous study [2)]. A novel α–glucan–protein complex with immunomodulatory activity was also succesfully isolated from the mycelium of the fungus[3)].

Despite its excellent and diverse biological properties, the difficulty in cultivating the fruiting bodies and limited availability have restricted detailed studies. Therefore, more study on *T. matsutake* would provide more information on its bioactive properties.

[Methods and Results]

Fresh fruiting bodies of Japanese (14 kg) and Chinese (12 kg) *T. Matsutake* were extracted with EtOH and acetone respectively. The crude extracts were combined and partitioned between *n*–hexane and H_2O and then EtOAc and H_2O. The EtOAc soluble part (20.3 g) of Chinese *T. matsutake* and hexane soluble part (52.2 g) of Japanese *T. Matsutake* were separated by silica gel flash column chromatography yielding 19 and 14 fractions respectively, and then were further purified by HPLC. As a result, a number of compounds were successfully isolated. The structure identification of each compound was measured by the interpretation of the IR, MS and NMR spectra. Henceforward, bioassay tests will be conducted to discover the bioactivities of compounds from the mushroom.

1) Laird, A. S., *et al..Wild Product Governance.*, 245. (2012)
2) Cheng, H., *et al..Natural Product Research.,* 20, 58-64. (2015)
3) Hoshi, H.,*etal..J. Agric. Food Chem*, 53, 8948-8956. (2005)

Tricholoma matsutake, bioactive compound, structure determination

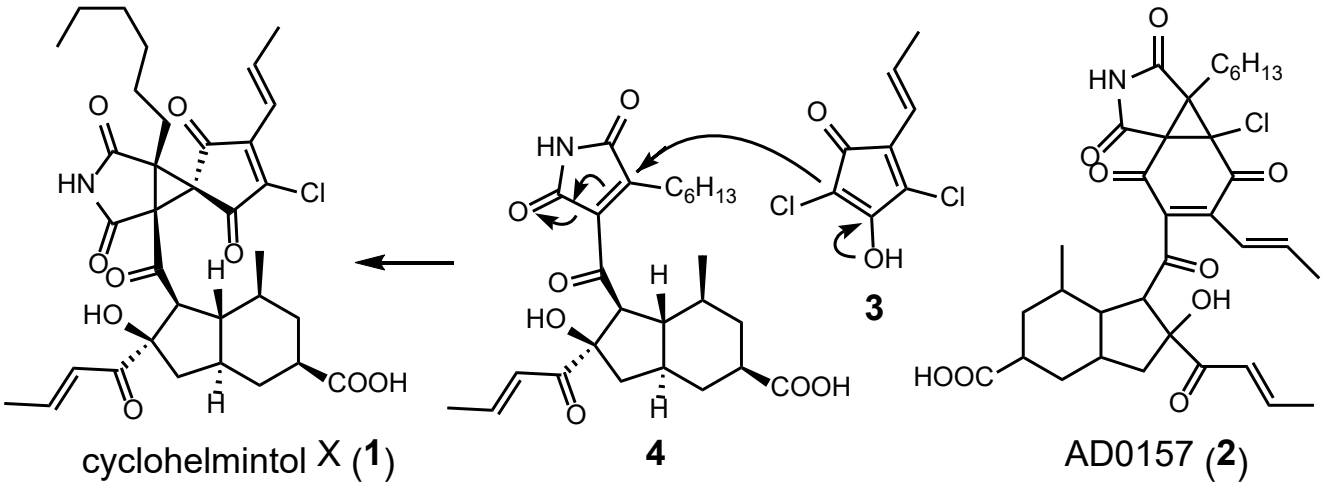
発表責任者：Hirokazu KAWAGISHI（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A18a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A18 会場

Cyclohelminthol X の単離・構造
Isolation and the Structure of Cyclohelminthol X

○橋本 勝[1]、田中 静也[1]、福士 江里[2] ([1]弘前大農生、[2]北大院農)
○Masaru HASHIMOTO[1], Sizuya Tanaka[1], Eri Fukushi[2] ([1]Hirosaki Univ., [2]Hokkaido Univ.)

我々は、*Helminthosporium velutinum* yone96 より、シクロペンテン環を有する cyclohelmintol 類を報告した (*Tetrahedron* **2016,** *72*, 1400)。さらなる探索の結果、分子式 $C_{34}H_{40}O_9NCl$ を有する cyclohelmintol X (**1**)を単離した。スペクトル解析から得た部分構造に基づいて文献検索を行ったところ、このもののスペクトルデータは AD0157 (**2**)のものと一致すると判明した。高分解能条件で ^{13}C NMR を測定したところ、重メタノール中で 146 ppm の炭素シグナルは強度比 3：1 で分裂して観測され、塩素原子は sp^2 炭素に結合していることが判明、単離した **1** は AD0157 ではないと結論した。その後の解析により 6 置換スピロシクロプロパン構造を有する **1** の構造を推定した。本構造では、構造決定に有用なプロトンが少なく、通常の解析では十分な情報が得られなかったことから、配座解析の後、ωB97X-D/6-31G*により化学シフトを計算し、Boltzmann 分布に基づく補正の後、候補異性体の絞込みを行い、BHLYP/def2-TZVP// ωB97X-D/6-31G*、続く Boltzmann 分布に基づく補正により理論円二色性スペクトルを求め、実験値と比較することにより。絶対配置を含めた **1** の全構造を決定した。同菌培養液から得られる cyclohelmintol IV の酸化により誘導されるエノール **3** と、無水マレインイミド誘導体 **4** との Michael 付加をきっかけとしたシクロプロパン化反応によって、**1** の生合成を矛盾無く説明することができる。



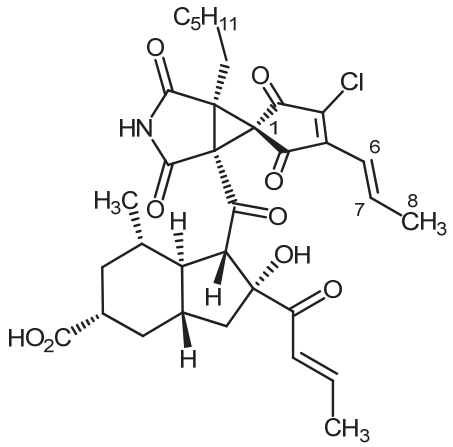
cyclohelminyhol X, DFT calculation, theoretical spectra

発表責任者：橋本勝（hmasaru@cc.hirosaki-u.ac.jp）

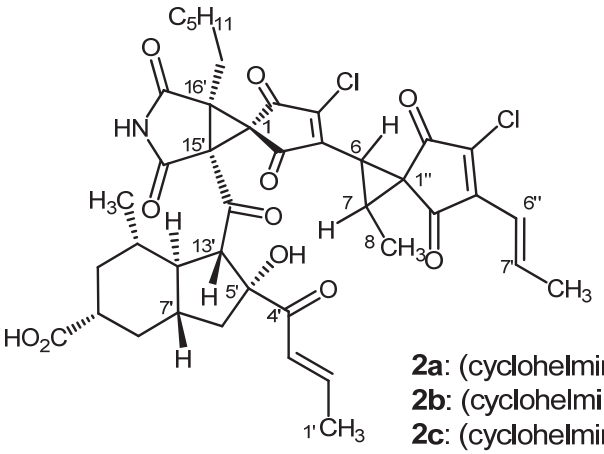
講演番号：2A18a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A18 会場

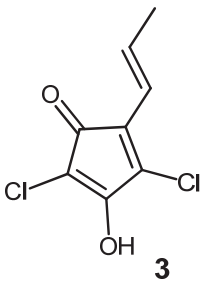
Cyclohelminthol Y の構造
The structure of Cyclohelminthol Y
○田中 静也、橋本 勝 (弘前大学)
○Shizuya TANAKA, Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

前演者は、*H. velutinum yone96* から単離した cyclohelminthol X (**1**)を報告した。同菌培養液を精査したところ、cyclohelminthol Y (**2a-2d**)と命名した 4 化合物を単離した。LCMS から **2a-2d** は同一分子量であり、また ^{1}H、及び ^{13}C NMR スペクトルは互いに酷似しており、これらはジアステレオマーであると推定した。いずれも **1** でオレフィン領域に見られた H-6, H-7 が 2-3 ppm 付近に観測されたことを除き、**1** のそれとも類似していた。HMBC スペクトルを詳細に解析したところ、これらはいずれも C6,C7,C1”で新たなシクロプロパンを有していることが判明した。**2a-2d** において δ ^{13}C のバラツキを二乗平均平方根として評価したところ、最も大きい C1”で 1.05 ppm と差異は小さく、DFT 法による理論化学シフト値の精度内であり、単純な比較で議論することはできなかった。またこれらの円二色性スペクトルには特徴的な違いが無く、計算 ECD スペクトルも効果的な議論にならなかった。再び、δ ^{13}C 化学シフトを解析したところ、化学シフト差異が大きな炭素は理論化学シフトにおいても差異が大きい傾向があり、化学シフト差異 RMS 値が 0.20 ppm 以上の 10 個の炭素核を抽出し、計算化学シフトと比較したところ、下記にした立体化学の場合例外なく化学シフトの傾向が一致したことにより、立体化学を推定した。これらは 1 の C6C7 二重結合に **3** が、マイケル型付加反応をきっかけとしたシクロプロパン化により生じたと考えることができる。



1: (cyclohelminthol X)





3

2a: (cyclohelminthol Y1, 6*R*,7*R*,1"*S*)
2b: (cyclohelminthol Y2, 6*S*,7*S*,1"*S*)
2c: (cyclohelminthol Y3, 6*R*,7*R*,1"*R*)
2d: (cyclohelminthol Y4, 6*S*,7*S*,1"*R*)

Cyclohelminthol

講演番号：2A18a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A18 会場

高等菌類の子実体形成物質の探索

Search for fruiting body-inducing compound(s) in higher fungi

○呉 静[1]、内田 和輝[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大・グリーン研、[2]静大院・総合農、[3]静大院・創造）
○Jing WU[1], Kazuki UCHIDA[2], Jea-Hoon Choi[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3]
([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Unvi.)

【目的】

多くの生物種は、特有のホルモンを有している。しかし、高等菌類であるキノコにおけるホルモンは全く明らかにされていない。キノコ（子実体）を発生させる高等菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、そして子実体から胞子という生活環を持っている。我々は、この生活環の各段階はキノコ共通のホルモンによって制御されているという仮説を持つ。本研究ではキノコ生活環制御ホルモン、特に子実体発生（発茸）ホルモンの発見を目的とした。

以前に本大会で、我々はキノコホルモン候補として、サケツバタケから単離された前例の無いステロイド骨格化合物strophasterol A-D[1-3]や茶樹茸から単離されたステロイドchaxine A-E[3-5]およびフェアリー化合物[6-8]によるキノコ菌糸体の成長制御に関する研究を報告した。様々なキノコは、その発生時に菌糸体表面に液体を分泌する。我々は、この液体が子実体形成に深く関与していると考え、fruiting liquid（FL）と命名した。本研究ではクリタケ（*Hypholoma sublateritium*）のFLからの活性物質を目的とした。

【方法・結果】

クリタケ（*H. sublateritium*）の FL 600 mL をヘキサンおよび酢酸エチルで液-液分配を行った。得られた酢酸エチル可溶部 190 mg をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果，酢酸エチル可溶部から新規化合物の単離に成功した。この化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。現在、マツタケやエノキタケ菌糸体等を用いて、これらの化合物の菌糸成長、子実体形成に及ぼす影響を検討している。

1) Wu, J. *et al.*, **Angew. Chem., Int. Ed.,** 51, 10820-10822 (2012)
2) Wu, J. *et al.*, **Biosci. Biotechnol. Biochem.,** 77, 1779-1781 (2013)
3) 呉静ら、平成 26 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P259
4) Kawagishi, H. *et al.*, **Heterocycles**, 69, 253-258 (2006)
5) Choi, J-H. *et al.,* **Tetrahedron**, 65, 9850–9853 (2009)
6) 呉静ら、平成27年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P1518
7) 呉静ら、平成28年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P120
8) 呉静ら、平成29年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P1190

structure determination, *Hypholoma sublateritium*, mycelium growth regulation

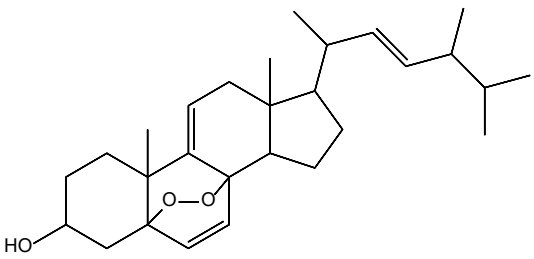
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

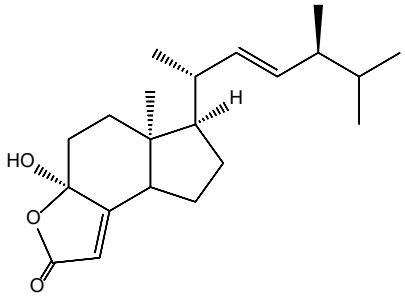
講演番号：2A18a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A18 会場

ヤマブシタケ胞子(*Hericium erinaceus*)由来の生体機能物質の探索
Search for biologically functional compounds from spore of *Hericium erinaceus*
○石岡 達朗[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Tatsuro ISHIOKA[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的および背景】
ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）は、サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の食用キノコである。過去に当研究室では、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone類およびerinacine類をヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見し、培養ろ液からerinapyrone類およびerinaceolactone類を発見した[1, 2)]。しかし、胞子に関する研究は行われていなかった。そこで、ヤマブシタケ胞子からの生体機能物質の探索を開始し、昨年度、胞子の酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物が単離されたことを報告した[3)]。本研究では、引き続きヤマブシタケ胞子由来の生物活性物質の単離、精製、構造決定を試みた。

【方法および結果】
ヤマブシタケ胞子をミキサーで粉砕したのち、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、エタノール、水で順次抽出し、固-液分配により、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、以下に示す2つの既知化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生物活性について検討している。





1）河岸洋和，キノコからの生体機能分子，*有機合成化学協会誌*，68, 514-521 (2010)
2）Jing Wu et al, *J. Nat, Prod.* 78, 155-158, 2014
3）石岡達朗ら，平成28年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Hericium erinaceus, spore

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A18a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A18 会場

イネ紋枯病菌によるフィトアレキシン代謝産物の構造決定及び抗菌活性

Structure determination and antifungal activity of phytoalexin metabolites by rice sheath blight fungus

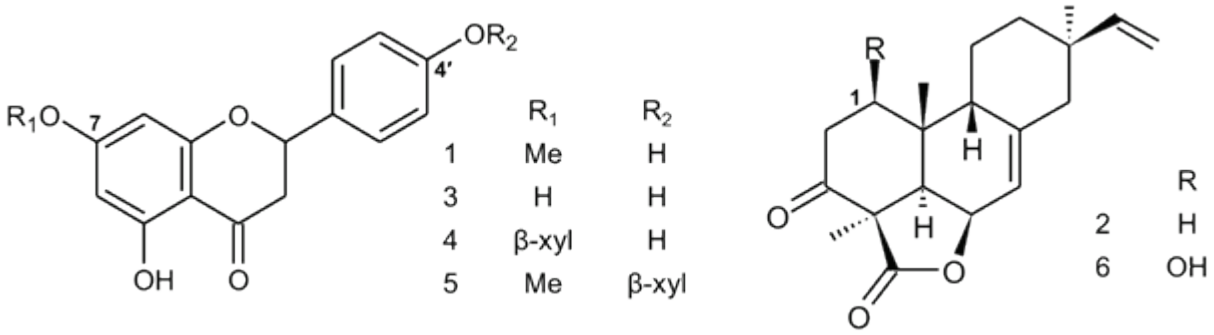
○勝間田 駿、隠塚 修平、戸嶋 浩明、長谷川 守文（茨城大農）
○Shun KATSUMATA, Shuhei ONZUKA, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi HASEGAWA (Ibaraki Univ.)

【目的】

植物の病害抵抗性機構の一つであるフィトアレキシンは，感染により生合成が誘導される抗菌性の低分子有機化合物である．一方で，植物病原菌は病害抵抗性を回避する能力を持っており，フィトアレキシンの解毒代謝能を持つ場合がある．我々はイネのフラボノイド型フィトアレキシンであるサクラネチンがイネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）による酸化的代謝（水酸化・脱メチル化）を経て解毒されることを明らかにしている．また，サクラネチン（**1**）とジテルペン型フィトアレキシンのモミラクトン A（**2**）がイネの重大病原菌である紋枯病菌（*Rhizoctonia solani*）によっても代謝されることを見出している．本研究ではその代謝産物の単離・構造決定を目的とし，それら代謝産物の紋枯病菌に対する抗菌活性評価も行った．

【方法・結果】

サクラネチン，またはモミラクトン A を添加した紋枯病菌液体培地のメタノール抽出液を LC/MS に供し，代謝産物の候補化合物を探索した．これらを逆相 HPLC によって単離し，NMR や MS によるスペクトル解析から構造決定を行った．紋枯病菌によるサクラネチンの代謝産物としてすでにナリンゲニン（**2**）を同定していたが，新たに 2 つのフラボノイド配糖体 naringenin-7-*O*-β-D-xylopyranoside（**3**）と sakuranetin-4′-*O*-β-D-xylopyranoside（**4**）を同定した．またモミラクトン A 代謝産物として 1β-hydroxymomilactone A（**6**）を同定した．本発表では，それらの代謝産物の紋枯病菌液体培地中での蓄積量や，紋枯病菌に対する抗菌活性についても併せて報告する．



phytoalexin, rice, *Rhizoctonia solani*

講演番号：2A18a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A18 会場

黒穂菌(*Ustilago esculenta*)由来植物成長調節物質に関する化学的研究
Chemical studies on plant growth regulators from *Ustilago esculenta*
○森 拓未[1]、西山 祐貴[1]、呉 静[4]、崔 宰熏[3,4]、徳山 真治[3]、平井 浩文[3,4]、河岸 洋和[2,3,4] ([1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大農・応生化、[4]静大・グリーン研)
○Takumi Mori[1], Yuki Nishiyama[1], Jing Wu[4], Jae-Hoon Choi[3,4], Shinji Tokuyama[3], Hirofumi Hirai[3,4], Hirokazu Kawagishi[2,3,4] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Appl. Biol. Chem., Faculty of Agr., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ.)

【目的】

マコモタケは、イネ科マコモ属に属するマコモ (*Zizania latifolia*) が黒穂菌 (*Ustilago esculenta*) に感染することで、茎の根元が肥大し生じる共生体であり、中華料理では高級食材として知られている。この肥大の原理として、黒穂菌が感染するとオーキシンが盛んに分泌され、茎での細胞分裂が活性化し、肥大化することで形成されるという説がある。これまでに、我々はオーキシン以外の肥大化誘導物質が存在すると仮定し、その原因物質の探索を試みてきた。現在までにマコモタケから6つの化合物[1-3]、黒穂菌培養ろ液から4つの化合物[4]を新規物質として単離したが、さらなる化合物の探索を試みた。本研究では黒穂菌培養ろ液から更なる化合物の探索を行い、単離した化合物を活性試験に供することで黒穂菌由来の植物成長調節物質に関する化学的研究を目的とした。

【方法・結果】

黒穂菌を約1週間、ポテトデキストロース培地中で液体培養した。得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分けた。培養ろ液を*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール、メタノールおよび水で順次抽出した。以前の研究より酢酸エチル可溶部にレタス伸長阻害活性が見られたため、酢酸エチル可溶部の分画を進めた。現在、酢酸エチル可溶部から単離した化合物の構造解析を行っているほか、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。

1) J.-H. Choi, *et al*., *Tetrahedron Lett*. **55**, 3596-3599, (2014)
2) T. Suzuki, *et al*., *Bioorga. Med. Chem. Lett*. **22**, 4246-4248, (2012)
3) H. Kawagishi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**, 5481-5483, (2013)
4) 西山祐貴ら、平成 29 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.49

Zizania latifolia, *Ustilago esculenta*, isolation

講演番号：2A18a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A18 会場

ナラタケ属が産生する生物活性物質に関する化学的研究
Chemical studies on bioactive compounds from Armillaria sp.
○上石 優作[1]、森 拓未[3]、関谷 敦[4]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・総合農、[4]森林総研)
○Yusaku KAMIISHI[1], Takumi MORI[3], Atsusi SEKIYA[4], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sci. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Forestry and Forest Products Research Institute)

【目的】

タマバリタケ科ナラタケ属 (*Armillaria* sp.) に属する一連のキノコは、現在40種類程が種として認められているが、多数の亜種や変種に富むことが知られている。また、古くから世界中の広い地域で食用として利用されてきた。その一方で、ナラタケ属のキノコは生きている植物に対する影響が非常に強く、その寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケ属のキノコは他の菌類に対する影響も強く、タマウラベニタケ (*Entoloma abortivum*) やオオミノミミブサタケ (*Wynnea americana*) は近傍にナラタケの菌糸があると奇形子実体を生じることが知られている[1]。しかし、「ナラタケ病」や他の菌類に対する奇形子実体誘導の化学的解明は一切なされていなかった。そこで我々は研究を開始し、現在までに2種のナラタケ属菌株（488株および543株）の培養ろ液および543菌株の菌糸体抽出液からレタスの根や胚軸に対して植物成長調節活性や、複数のキノコに対して菌糸体伸長抑制活性、奇形子実体誘導活性を有する複数の化合物の単離を報告してきた[2-5]。本研究では、488株および543株からの更なる生物活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

ナラタケ属488菌株および543菌株を約3週間、ポテトデキストロース培地中で液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌糸体および培養ろ液に分けた。菌糸体を*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で抽出し、順次分画した。このうち543株の*n*-ヘキサン可溶部から1種類の新規化合物および数種類の既知化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。また、488株の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、生物活性物質を探索中である。また、それらの化合物のうち収量の多いものを各種活性試験に供する予定である。

1) 安藤 洋子, 千葉菌類談話会通信 2000, 16-17 号, 19-25
2) H. Kobori *et al*., *Tetrahedron lett*. 2013, 54, 5481-5483
3) H. Kobori *et al*., *J. Nat. Prod.*, 2015, 78, 163-167.
4) D, M. Reddy. *et al., J. Nat. Prod.*, 2017, 80, 2561-2565.
5) 森 拓未ら、平成 29 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.1187

Armillaria sp., structure determination, mycelium

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

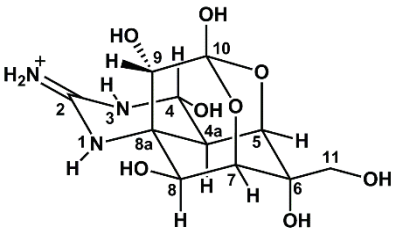
講演番号：2A18a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A18 会場

海洋生物における新規テトロドトキシン関連化合物の探索

Screening of novel tetrodotoxin-related compounds in marine organisms

○上山 望、杉本 敬太、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

[背景]テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**) はフグ毒として知られており、電位依存性ナトリウムチャネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。海洋生物では、フグ以外にもタコ、カニ、巻貝、ヒラムシ等に広く分布しており、陸棲生物では、一部のカエルやイモリに存在している。しかし、生合成経路・代謝経路は未だ解明されておらず、強力な生理活性と高度に架橋した構造から興味が持たれる。当研究室では TTX 生合成経路の解明に向け、多くの TTX 類縁体を探索してきた。[1] その結果、有毒イモリから 10-hemiketal 型 TTX 類縁体や 5 種の二環性グアニジノ化合物を単離し、その構造からモノテルペン由来の生合成経路を提唱した。[2] 一方、海洋生物からは、イモリから得られたこれらの化合物群は検出されなかったが、他の新規環状グアニジノ化合物群の存在が示され、その内数種の化合物について昨年度の本大会で報告した。今回さらに、海洋生物から類似化合物を単離、構造決定したので報告する。



TTX (**1**)

[方法] TTX を高濃度に保有する海洋生物の抽出物を LC-MS/MS を用いて精査し、TTX 関連化合物と考えられる分子式を示す微量成分を探索した。これらの微量成分を各種クロマトグラフィーにより単離・精製し、高分解能 ESI-TOF-MS と各種 NMR を用いて構造解析を行った。

[結果・考察] 構造解析の結果、得られた化合物はいずれもグアニジノ 6 員環を有する二環性化合物であると判明した。また、これらの化合物は昨年度に報告した化合物同様、TTX が高度に還元された構造を有していた。そのため、多段階の酸化反応を経て TTX が生合成されると推定したこれまでの生合成経路を支持していた。

[References]

1. Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Riston-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.;Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813. b) Kudo, Y.; Finn, J.; Fukushima, K.; Sakugawa, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1000–1004.
2. Kudo, Y.; Yamashita, Y.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yasumoto, T.; Yotsu-Yamashita M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546–14549. b) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731.

tetrodotoxin, pufferfish, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A18a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A18 会場

記憶喪失性貝毒ドウモイ酸の生合成経路に関する研究

Study of the biosynthetic pathway of domoic acid, the causative toxin of amnesic shellfish poisoning

○前野 優香理[1]、小瀧 裕一[2]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]福島学院大学)
○Yukari Maeno[1], Yuichi Kotaki[2], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Fukushima College)

【背景・目的】記憶喪失性貝毒ドウモイ酸 (Domoic acid, DA) は、神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸受容体に結合し、受容体を過度に活性化することで、ヒトに記憶喪失の症状を引き起こす。DA や、その類縁体イソドウモイ酸 A、B の生産生物としては数種の珪藻が報告されており、[1] ゲラニル二リン酸と L-グルタミン酸の二成分から生合成されることが提唱されてきた(Figure 1)。[2] しかし、これまで DA 生合成中間体は見つかっておらず、詳細な経路は未解明であった。そこで我々は、DA を高濃度に含有する紅藻ハナヤナギ *Chondria armata* から新規 DA 関連化合物を探索し、6 種の微量成分を単離し、またそれらのうち 2 種については化学合成して構造決定した。得られた 6 種の化合物は、全て新規化合物であり、構造的特徴から DA 生合成中間体と考えられ、昨年度の本大会で新たな生合成経路を提唱した。本研究ではこの推定生合成経路を確かめるべく、DA 生産珪藻 *Pseudo-nitzschia multiseries* を培養し、推定された生合成中間体の探索し、安定同位体標識した生合成中間体の取り込み実験を行った。

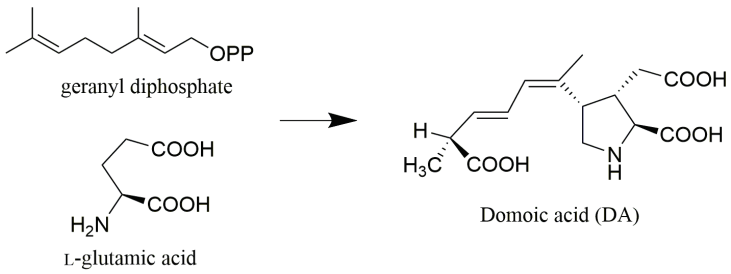


Figure 1 Proposed biosynthetic precursors of DA.

【方法】*P. multiseries* を植え継ぎ後 1 ヶ月間培養し、DA の生産初期から経時的に培養液を収穫した。収穫した培養液のうち *P. multiseries* の細胞内抽出物を LC-MS/MS 分析し、*C. armata* より単離された化合物と同じ保持時間、MS/MS パターンを示すものを探索した。また、推定生合成中間体のうち 1 種を安定同位体標識して化学合成し、培地に添加後、DA の生産時期に培養液を LC-MS 分析した。

【結果】*P. multiseries* の細胞内抽出物から、*C. armata* より単離された化合物のうちの一部が検出された。また、取り込み実験においては添加した生合成中間体が変換されたことを示す、標識化された DA が検出された。これらの結果は推定した DA 生合成経路を支持するものであった。

1) Kotaki, Y. *et al*., *Toxicon* **2005**, 46, 946–953.

2) Douglas, D. J. *et al*., *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1992**, 9, 714–716.

domoic acid, biosynthesis, amnesic shellfish poisoning

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A18a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A18 会場

ムレオオフウセンタケ由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from *Cortinarius praestans*

○高橋 真奈美[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Manami TAKAHASHI[1], Wu Jing[2], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizioka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

ムレオオフウセンタケ（*Cortinarius praestans*）はフウセンタケ科フウセンタケ属に属するキノコで、秋にコナラ、ミズナラなどのナラ類の林内に群生する食用キノコである。子実体の粗抽出物は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性が報告されているが、このキノコに関する研究はあまり行われておらず、生体機能性物質に関する化学的研究は皆無である[1)]。

本研究では、ムレオオフウセンタケの子実体由来の新規機能性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

ムレオオフウセンタケ子実体 25.0 kg を 70%エタノール、アセトンで順次 2 回ずつ抽出、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。その後、ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液-液分配、エタノールで固-液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部 13.5 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。

酢酸エチル可溶部から 4 種の化合物(化合物 1 15.1 mg、化合物 2 10.1 mg、化合物 3 2.3 mg、化合物 4 1.5 mg)の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析によって同定した。現在、これらの化合物を植物成長調節活性試験などに供している一方で、更なる化合物の単離を試みている。

1) Damjan Janes et al., *Pharmaceutical Biology*, 45, 9, 700-706, 2007

Cortinarius praestans, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A18a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A18 会場

Isolation of Bioactive Compounds from *Leucopaxillus giganteus*

○Irine Yunhafita Malya[1], Jing Wu[2], Etsuko Harada[3], Jae-Hoon Choi[2], Hirofumi Hirai[2], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Dci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, Japan)

[Background]

An edible mushroom, *Leucopaxillus giganteus* is commonly called Giant Funnel in English and Ooichotake in Japanese, which belongs to Tricholomataceae family grows in grassland and often forms ring shape[1)]. Evaluation of chemical constituents and nutritional values have been considerably studied[2)]. Nevertheless, research about bioactive compounds from the mushroom is scanty, and only clitocine has been examined its biological activities, such as antiproliferative effect[3)]. Therefore, we are trying to isolate other bioactive compounds, determine the structures and elucidate the biological activities.

[Methods and Results]

Fresh fruiting bodies of *L. giganteus* were extracted with EtOH and then acetone to obtain the crude extracts. The partition method divided them into *n*-hexane, EtOAc, and *n*-BuOH soluble parts. The EtOAc soluble part was subjected to silica gel flash column chromatography which was further purified by HPLC. As a result, some compounds have been successfully isolated. Structural determination of each compounds was performed by interpretation of the IR, MS and NMR spectra. Furthermore, the growth regulation assay on lettuce and cytotoxic assay on human lung cancer cell lines were conducted for all the compounds.

1) Ibeiro, R., *et al.. J. Agric. Food Chem.*, 56, 4769–4774. (2008)
2) Barros, L., *et al.. Food Chem.,* 105, 140-145. (2007)
3) Ren, G. Z., *et al.. Cancer Letters*, 262, 190–200. (2008)

Leucopaxillus giganteus, structure determination, plant growth regulation

発表責任者：Hirokazu Kawagishi（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A18a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A18 会場

Bioorganic chemicals studies on the edible mushroom *Cortinarius caperatus*

○ Arif Yanuaru RIDWAN[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

[Background]

Cortinarius caperatus, formerly known as *Rozites caperata* (gypsy mushroom in English; Shogenji in Japanese) is an edible mushroom and widely grows in areas with sandy soils at northern hemisphere[1]. This mushroom produces an antiviral, RC-183, toward Herpes simplex virus[2]. Recently, we have reported six compounds from the fruiting bodies of the fungus. Their biological activities were investigated toward lettuce, rice, and mycelia growth. Some of the compounds regulated the growth of lettuce and rice[2]. Herein, we present the further isolation, structural determination, and biological activities of bioactive compounds.

[Method and Results]

The fruiting bodies of *C. caperatus* were crushed and extracted with EtOH and then with acetone. The EtOH and acetone extracts were combined, concentrated and partitioned between *n*-hexane and water, ethyl acetate and water, and *n*-butanol and water, successively. The *n*-hexane and EtOAc soluble parts were subjected to silica gel column chromatography and repeated chromatography, respectively. In our ongoing search for bioactive compounds, several compounds were purified. Their chemical structures were determined by interpretation of IR, MS and NMR spectra. The compounds were examined toward fungus and plant growth regulatory activities.

[References]

1) Falandysz, J. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 110, 68–72.
2) Ridwan, A.Y., et al. *Mycoscience*, 2017, advanced online publication.

Cortinarius caperatus, structure determination, mycelia/plant growth regulating compound

発表責任者：Hirokazu Kawagishi（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A19a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A19 会場

動物細胞 HEK293T を使った昆虫ホルモンアゴニストの活性評価系

Bioassay for insect hormone agonist using HEK293T cells

○名部 拓[1]、林 謙一郎[2]、石塚 千遥[1]、原島 小夜子[3]、八木 孝司[3]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1]（[1]京大院・農、[2]阪大院・医、[3]大府大院・理）

○Taku NABE[1], Kenichiro HAYASHI[2], Chiharu ISHIZUKA[1], Sayoko HARASHIMA[3], Takashi YAGI[3], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Medicine, Osaka Univ, [3]Grad. Sch. Science, Osaka Pref. Univ.)

【目的】昆虫の脱皮を司る脱皮ホルモン(Molting hormone; MH)と変態や卵巣の成熟を制御する幼若ホルモン(Juvenile hormone; JH)は、非ペプチド性の昆虫ホルモンとして知られている。これらの生理活性から、MH および JH アゴニストは昆虫特異的に作用する安全性の高い農薬としての利用が期待されており、実際に複数のアゴニストが実用化に至っている。
これらのアゴニストのさらなる探索・開発のためには、効率的にアゴニスト活性を評価する系が必要となる。MH および JH のアゴニスト活性を測定するアッセイ系として、放射性同位体を用いた結合親和性測定法[1)]や酵母を用いたレポーターアッセイ法[2)]が報告されている。しかし前者は RI 利用設備が必要であること、後者は細胞壁が基質の細胞透過性に影響し、受容体レベルでの正確な活性評価ができないことが難点として挙げられる。そこで本研究では細胞壁を有しない哺乳動物細胞を用いて、MH および JH アゴニスト活性を測定するレポーターアッセイ系の確立を試みた。

【方法】24 穴プレートに播種した HEK293T 細胞に対して各ホルモンの受容体発現プラスミド、転写共役因子発現プラスミド、応答配列の下流にホタルルシフェラーゼをコードしたレポータープラスミド、そしてコントロールとして恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドを導入した。この細胞を 5%CO_2 雰囲気下 37℃、24 時間培養後、供試化合物の DMSO 溶液を投与し、さらに 24 時間培養した。細胞を溶解後、デュアルルシフェラーゼアッセイ法によって転写誘導活性を測定した。測定結果をもとに濃度応答曲線を作成し、EC_{50} の逆対数値である pEC_{50} を活性の指標として算出した。供試化合物には先行研究にて活性が評価されている複数の既知化合物を用いた。

【結果および考察】全ての供試化合物において、良好な再現性で pEC_{50} を算出することができた。ゆえに、HEK293T 細胞を用いたレポーターアッセイ系は MH および JH アゴニスト活性を評価するうえで有用であると考えられる。

[1)] Miura *et al.*, *FEBS Journal*, **272**, 1169 (2005), [2)] Harashima *et al.*, *FEBS Open Bio*, **7**, 995 (2017)

Insect hormone, Luciferase assay, HEK293T cell

講演番号：2A19a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A19 会場

植物寄生性線虫の生体アミン受容体の単離と解析
Identification and characterization of biogenic amine receptors in plant parasitic root-knot nematode
○光増 可奈子、澤 進一郎、太田 広人 (熊大院先端科学)
○Kanako MITSUMASU, Shinichiro SAWA, Hiroto OHTA (Kumamoto Univ.)

【目的】生体アミンは、神経伝達物質として受容体を介してシグナルを伝達し、無脊椎動物の行動制御にも深く関わっていることが知られている。例えば、モデル生物でもある、自活性の土壌線虫 *Caenorhabditis elegans*（*C.elegans*）では、ドーパミン（DA）やオクトパミン（OA）受容体の欠損により、忌避行動が修飾される。*C. elegans* と同じく土壌線虫であり、植物寄生性の農業害虫であるサツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita*（*M. incognita*）は、宿主植物の根に誘引されて寄生行動をとる一方で、忌避植物の根からは遠ざかる忌避行動をとることが知られている。しかし、*M. incognita* の忌避行動やその他の寄生関連行動に関して、生体アミンやその受容体を介したシグナル伝達による制御機構については、これまでにほとんど解明されていない。無脊椎動物特異的な生体アミンである OA の関わる神経経路は、害虫に対する有望な農薬の標的となっていることなどから、植物寄生性線虫の行動の生体アミンによる制御機構は、線虫防除の観点からも非常に重要な研究対象となり得る。そこで、生体アミンとその受容体を介した、*M. incognita* の寄生関連行動の制御機構を明らかにする一助として、今回は、*M. incognita* の生体アミン受容体の同定と薬理学的特性の解析を行うこととした。
【方法と結果】*M. incognita* のゲノムアノテーション情報から、OA、チラミン（TA）、DA、セロトニン（5-HT）に対する生体アミン受容体の、断片配列を含む 22 種類の候補配列を抽出した。次に、前述の配列から、全長を含む 12 種類の候補配列について、*C. elegans* とショウジョウバエ由来の既知の生体アミン受容体の配列を用いて系統解析を行い、ネコブセンチュウ受容体候補配列の内在性リガンドと薬理学的特性を予測した。現在、各候補遺伝子の発現ベクターへのクローニングを進めている。その後、培養細胞発現系を用いて、cAMP や Ca^{2+}を指標にした受容体の機能解析を行い、特異的リガンドの決定や、薬理作用について解析する予定である。

root-knot nematode, biogenic amine, receptor

発表責任者：光増可奈子（kamitsu@kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：2A19a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A19 会場

昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo と阻害化合物の生化学的・構造生物学的解析：新規農薬開発に向けて
Structure and biochemical analysis of insect specific glutathione S-transferase Noppera-bo and its inhibitor compounds for development of new insecticides

○稲葉 和恵[1]、小祝 孝太郎[2]、諸橋 香奈[1]、塩谷 天[1]、荒井 怜奈[3]、小島 宏建[4]、岡部 隆義[4]、長野 哲雄[4]、井上 英史[5]、藤川 雄太[5]、湯本 史明[2]、千田 俊哉[2]、丹羽 隆介[6]([1]筑波大院・生命環境、[2]高エネ研・物構研・構造生物、[3]筑波大・生命環境学群、[4]東大・創薬機構、[5]東京薬大・生命科学、[6]筑波大・生命環境)
○Kazue Inaba[1], Kotaro Koiwai[2], Kana Morohashi[1], Sora Enya[1], Reina Arai[3], Hirotatsu Kojima[4], Takayoshi Okabe[4], Tetsuo Nagano[4], Hideshi Inoue[5], Yuuta Fujikawa[5], Fumiaki Yumoto[2], Toshiya Senda[2], Ryusuke Niwa[6] ([1]Grad. Sch. of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, [2]Structural Biology Research Center, IMSS, KEK, [3]College of Biological Sciences, Univ. of Tsukuba, [4]OCDD, Univ. of Tokyo, [5]Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences, [6]Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

ステロイドホルモンは、多細胞生物において個体の発育や性成熟、また恒常性の維持に重要な役割を持つ。昆虫におけるステロイドホルモンはエクジステロイドであり、脱皮や変態といった過程で重要な役割を示す。エクジステロイドは昆虫特異的なステロイドホルモンであり、哺乳類のステロイドホルモンとは異なる化学構造を持つ。よって、エクジステロイドの生合成や受容機構を阻害する化合物は、標的選択性が高く環境に調和した昆虫発育制御剤(IGR)になると期待される。しかし、これまでにエクジステロイド生合成を担う酵素や制御因子を標的とした化合物はほとんど知られていない。

このような中で我々は、エクジステロイド生合成に特異的に関与するグルタチオン *S*-転移酵素（GST）である Noppera-bo (Enya et al. *Sci. Rep.* 4:6586, 2014., Enya et al. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61: 1-7, 2015.) をターゲットとした酵素活性阻害化合物の探索、およびその作用機序の解明を通じて、将来的な新しい IGR の発掘・開発を目指している(丹羽隆介. *化学と生物* 54: 508-513, 2016.)。現在までに我々は、組換え Noppera-bo タンパク質のグルタチオン抱合活性を、GST 活性検出蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いて高感度かつハイスループットに検出するアッセイ系を確立している (Fujikawa et al. *Chem. Comm.* 51: 11459-11462, 2015.)。このシステムを活用して我々は、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、ハマダラカ *Anopheles gambiae*、そしてコナガ *Plutella xylostella* に由来する組換え Noppera-bo タンパク質のいずれに対しても *in vitro* で阻害活性を示す化合物を 13 種の化合物を得た。さらに、Nobo と阻害剤の作用機序を解明するため、Nobo タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。その結果、キイロショウジョウバエとネッタイシマカ *Aedes aegypti* の 2 種の昆虫における Nobo の立体構造を明らかにし、さらには一部の阻害剤と Nobo との複合体構造も明らかにした。2 種の Nobo の立体構造を比較したところ、ネッタイシマカ Nobo の基質結合ポケットは、ショウジョウバエ Nobo の基質結合ポケットよりも広がっていることが明らかになった。この種間による構造の違いは、幾つかの化合物のネッタイシマカ Nobo に対する阻害効果がショウジョウバエ Nobo に対する効果に比べて有意に低いことに関連するのではないかと考えている。今後は、得られた化合物を出発点として、さらに効果的な阻害剤の開発を目指す。

ecdysteroid, cholesterol, glutathione S-transferase (GST)

発表責任者：丹羽 隆介（ryusuke-niwa@umin.ac.jp）

講演番号：2A19a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A19 会場

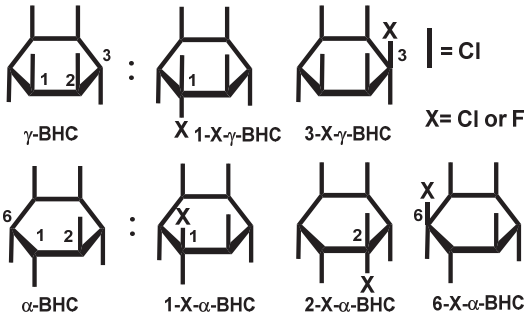
γ-BHC 骨格にフッ素原子あるいは塩素原子を付加した化合物の殺虫活性および GABA アンタゴニスト活性

Insecticidal and GABA antagonist activities of γ-BHC analogs on which fluorine or chlorine atom is bound.

○田中 啓司[1]、岩井 崇晃[1]、坂本 賢昭[1]、尾添 嘉久[2]、赤松 美紀[3]、松田 一彦[1] ([1]近畿大農、[2]島根大生物資源、[3]京大院農)

○Keiji Tanaka[1], Takaaki Iwai[1], Takaaki Sakamoto[1], Yoshihisa Ozoe[2], Miki Akamatsu[3], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kindai Univ., [2]Shimane Univ., [3]Kyouto Univ.)

【目的】 γ-BHC はベンゼンを光塩素化して得られる BHC (HCH、1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane、$C_6H_6Cl_6$、8 種類の立体異性体が存在)の異性体の 1 つで、殺虫活性と抑制性神経伝達物質 GABA の受容体に対し高いアンタゴニスト活性を示す化合物である。非常に不思議なことには 8 種類存在する BHC 異性体の中で、このγ-異性体のみが高い活性を示し、他の異性体にはα-BHC に弱い活性が認められるだけでその様な活性はなく、その理由は不明である。“なぜγ-BHC にのみ高い活性が？”の疑問に迫るべく、モノフルオロベンゼン(C_6H_5F)、モノクロロベンゼン(C_6H_5Cl)を光塩素化して得られる $C_6H_5FCl_6$ や $C_6H_5Cl_7$ の各立体異性体、特にγ-BHC やα-BHC と塩素原子の配向に関して同じ立体構造を有する化合物を合成し、対応するγ-BHC やα-BHC の殺虫活性、GABA アンタゴニスト活性と比較する。



【方法】 モノフルオロベンゼン、モノクロロベンゼンを光塩素化して $C_6H_5FCl_6$ や $C_6H_5Cl_7$ の各立体異性体を単離精製し、殺虫活性や GABA アンタゴニスト活性評価試験に供試した。γ-BHC を四塩化炭素中で光塩素化して得られる $C_6H_5Cl_7$ も単離精製した。なお、それぞれの化合物の立体構造は PMR で確認した。殺虫活性は、イエバエ、チャバネゴキブリを用い、中毒症状の観察も含めて評価した。GABA アンタゴニスト活性はイエバエ頭部やラット脳から調製した神経膜画分に対する[^{3}H]-EBOB 結合阻害試験等で評価した。

【結果および考察】 γ-BHC と塩素原子の配向が同じである $C_6H_5FCl_6$ や $C_6H_5Cl_7$ の異性体には、BHC の炭素原子骨格にさらに付加するフッ素原子(F)や塩素原子(Cl)の位置により 2 種類の異性体が、α-BHC に関しては 3 種類の異性体が存在する。γ-BHC と同じ立体構造を有するフッ素原子や塩素原子付加化合物の殺虫活性や GABA アンタゴニスト活性は、γ-BHC に比べ少し劣るものの高い活性を有していた。α-BHC に関しては、γ-BHC あるいは対応するフッ素原子や塩素原子付加化合物に比べ、それらの活性は大きく減少した。ただ 1-Cl-γ-BHC と 1-Cl-α-BHC は同一の化合物であり、γ-BHC とα-BHC との中間の活性を示したことから、BHC の殺虫活性、GABA アンタゴニスト活性発現にはシクロヘキサン環に置換している塩素原子の配向が極めて重要であることが示唆された。

γ-BHC, GABA antagonist, insecticidal activity

発表責任者：田中啓司（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

講演番号：2A19a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A19 会場

植物の気孔密度を制御するペプチドホルモン stomagen のミミックペプチドの合成と構造活性相関
Synthesis and structure-activity relationship studies of mimicry peptide of stomagen that control stomatal density

○植田 健太、近藤 竜彦、小鹿 一 (名大院・生命農)
○Kenta UEDA, Tatsuhiko Kondo, Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

【背景・目的】
気孔は 1 対の孔辺細胞とその間に形成される空間からなる器官であり、陸生植物は気孔を通じて気体の交換を行う。光合成や、呼吸、蒸散といった生命活動は、この気孔を通じて行われることから、植物は気孔の密度を調節することによって、光合成などの効率を制御していることが徐々に明らかとなってきている。我々は、シロイヌナズナの気孔密度を上昇させるという興味深い生理活性を有する 45 残基のペプチドホルモン stomagen を同定した。その後、stomagen には分子中央部にループ構造が存在すること、およびそのループ構造を挟むように逆平行 β シート構造が存在することが報告された。stomagen のループ構造部分について、構造活性相関研究を行った結果、stomagen のループ構造の中央部分に存在する 6 残基のアミノ酸が、活性発現に重要であることを昨年度の本大会で報告した。本発表では、stomagen のループ中央部分の立体構造に着目し、stomagen の気孔密度上昇活性をミミックできる短鎖ペプチドを得ることを目的とした。さらに、この短鎖ペプチドの詳細な構造活性相関を解析することで、将来的には生理活性の発現に必須なファーマコフォアを明らかにし、その情報をもとにして気孔密度制御剤を開発することを目指す。

【方法・結果】
本研究では、stomagen と同一のファミリーに属し、stomagen と競合的に受容体に結合することが報告されている EPF2 に着目した。両者のアミノ酸配列を比較すると、EPF2 にのみループ中央部に 4 対目のジスルフィド結合が存在する。stomagen において、対応する残基をシステインに置換し、4 対目のジスルフィド結合を導入したペプチド stomagen-CC は、stomagen とほぼ同等の活性を示した。この結果は、stomagen のループ部分の立体構造が、ジスルフィド結合で制限されている EPF2 の立体構造と類似していることを示唆している。そこで、stomagen-CC の立体構造を元に、分子モデリングソフトウェアを用いた安定配座解析を行った。得られた安定配座を元に、空間的に近接した残基ペアを置換して、ジスルフィド結合を導入した一連の短鎖ペプチドを設計および合成し、活性を調べた結果、有意な気孔密度上昇活性を示すペプチドが得られた。この結果は、stomagen のループ中央部の立体構造を模した小ペプチドによって、stomagen の気孔密度上昇活性をミミックできることを示唆している。現在、溶液中におけるこの短鎖ペプチドの立体構造を NMR を用いて解析しており、その結果についても合わせて報告する予定である。

stomagen, mimicry peptide, structure-activity relationship

講演番号：2A19a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A19 会場

近赤外生物発光材料の生体内イメージングにおける有用性

Advantage of NIR bioluminescence for in vivo imaging

○北田 昇雄[1]、木山 正啓[1]、齊藤 亮平[1]、岩野 智[2]、丹羽 治樹[1]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1]([1]電通大、[2]理研)
○Nobuo KITADA[1], Masahiro Kiyama[1], Ryohei Saito[1], Satoshi Iwano[2], Haruki Niwa[1], Takashi Hirano[1], Shojiro Maki[1] ([1]UEC, [2]RIKEN)

ホタル生物発光は、発光基質ホタルルシフェリンが発光酵素ホタルルシフェラーゼにより AMP 化され、続いて酸素化されることで、黄緑色（λ_{max} = 560 nm）の発光を示す。ホタル発光系の非常に高効率（ϕ_{BL} = 0.41）な発光を活かして、ライフサイエンスの分野で応用されている。
当研究室では、ルシフェリンの構造を改変することで可視光をほぼ網羅するような発光色を実現した(430～700 nm)。ホタルの黄緑色の発光は生体組織に吸収されやすいが、「生体の窓」とも呼ばれる近赤外領域（650～900 nm）ならば生体透過性が高く、生体イメージング材料への応用に望ましい。この当研究室で創製した多色化技術から、世界初の近赤外自発光材料アカルミネ®[和光純薬工業]（λ_{max} = 675 nm）や、さらに水溶性を高めた高水溶性発光材料 TokeOni [Sigma Ardlich]（λ_{max} = 675 nm）を製品化している。
イメージングの技術は日々進歩しているものの、いまだにマウス等の小動物を用いたイメージング実験が主流である。今後、最先端医療の研究を進めるにあたり、マウスやラットではなく、マーモセットやミニブタ等のさらに大型の動物での実験が必要不可欠となる。しかしながらこれらの中大型動物を用いた発光イメージングに最適化されているシステムが無かったため、実際に行われた例はない。そこで今回はこれらの近赤外生物発光材料が生体内イメージングにどれほど有用性を示すのか *in vitro* 実験、透過性実験を通して確認し、実際にミニブタを用いた *in vivo* イメージング実験にて、生体内からの発光を確認することにも成功した。本会にてこの詳細について発表する。

Luminescence, Imaging, Firefly

発表責任者：北田昇雄（kitada@lumi.pc.uec.ac.jp）

講演番号：2A19a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A19 会場

結晶スポンジ法によるビール苦味成分酸化物の相対および絶対立体構造決定
Determination of relative and absolute configuration in oxidation products of beer' bitter compounds by crystalline sponge method

○谷口 慈将[1,2,3]、菊池 貴[4]、藤田 誠[1,2] ([1]東大院工、[2]JST-ACCEL、[3]キリン基盤研、[4]リガク応技センター)
○Yoshimasa Taniguchi[1,2,3], Takashi Kikuchi[4], Makoto Fujita[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JST-ACCEL, [3]Kirin, [4]Rigaku)

【背景・目的】ホップはビールの必須原料であり、ホップに含まれるα酸やビール醸造中にα酸が異性化して生じるイソα酸は、ビールの苦味や泡持ちに寄与し、また抗菌性を有することからビールの品質に大きな影響を与える。α酸やイソα酸などの苦味酸はホップやビールの保存中に様々な骨格を有する酸化物に変化することが近年明らかになってきたが、相対および絶対立体構造まで明らかとなったものは少ない。酸化物の香味プロファイルや泡持ち効果、抗菌性などは化合物の立体構造によって異なると考えられ、立体構造を明らかにすることは、酸化制御技術を確立し高品質なビールを生産するために非常に重要な課題である。そこで、新しい分子構造解析手法として注目されている結晶スポンジ法（引用 1）を用いて、苦味酸酸化物の立体構造を明らかにすることを目的とした。
【方法】$ZnCl_2$ と 2,4,6-tri(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine (tpt)を MeOH/$CHCl_3$ 中で反応させ、結晶スポンジ $[(ZnCl_2)_3(tpt)_2\cdot(solvent)_x]_n$ を得た。スポンジ内の溶媒を適宜置換した後、結晶スポンジ 1 粒をバイアルに入れ、苦味酸酸化物（5～400 μg）を溶媒（10～50 μL）とともに添加した。苦味酸酸化物をスポンジ内に包摂させた後、結晶スポンジを取り出し、X 線結晶構造解析装置で分析した。X 線回折データは CrysAlisPro を用いて積分、吸収補正した後、SHELXT により初期構造を解き、SHELXL を用いて構造を精密化した。
【結果】分子内に 5 つの不斉点を有する tricyclooxyisoadhumulone A はエピマー対としてホップから単離された。両エピマーは NMR 等のスペクトル分析では全く区別がつかなかったが、結晶スポンジ法で解析することで、それぞれの絶対立体構造を明確に決定できた。また、過去に我々が報告し平面構造までしか明らかにできなかった *rac*-dicyclohumulinol 類（引用 2）を結晶スポンジ法で解析することでわずか 5 μg のサンプル量で相対立体構造を明らかにするこができた。同様に *rac*-scorpiohumulinol 類（引用 2）についても相対立体構造を X 線データにより確認できた。他にも複数の苦味酸酸化物の絶対立体構造解析にマイクログラムオーダーのサンプル量で成功しており、結晶スポンジ法が苦味酸酸化物の立体構造解析に極めて有力であった。今後、立体構造情報をもとに苦味酸酸化物の生成機構解明あるいは苦味受容体との相互作用や構造活性相関等が明らかになることが期待される。

引用文献 1 Inokuma et al., Nature, 2013, 495, 461-466
引用文献 2 Taniguchi et al., J. Agric. Food Chem., 2015, 63, 10181-10191

crystalline sponge, configuration analysis, bitter acid oxides

発表責任者：藤田誠（mfujita@appchem.t.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A19a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A19 会場

オジギソウ根粒菌 *Cupriavidus taiwanensis* における青枯病菌型とコレラ菌型クオラムセンシング機構の機能解析

phc and *tqs* quorum sensing in *Cupriavidus taiwanensis*, a nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa pudica*

○脇本 隆行、谷 修治、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Takayuki WAKIMOTO, Shuji TANI, Kenji KAI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】β-プロテオバクテリア *Cupriavidus taiwanensis* は，オジギソウ *Mimosa pudica* を宿主とする根粒菌である。本菌は植物病原菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* と近縁であり，その病原性に必須である *phc* クオラムセンシング（*phc* QS）などの発現調節に関わる遺伝子群を有している。また，動物病原菌であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* が持つ *tqs* QS も本菌のゲノムから見出されている。プロテオバクテリアで広く認められているアシルホモセリンラクトンをシグナル分子とする *lux* QS 系とは異なり，青枯病菌型（*phc*）とコレラ菌型（*tqs*）の QS は限られた細菌種でしか確認されていない。そこで本研究では，2 大病原菌と同種の QS が *C. taiwanensis* においてどのような機能を担っているのかを調べ，オジギソウ－*C. taiwanensis* 共生系に関与しているのかどうかを明らかにすることにした。昨年度の本大会にて，*phc* 系と *tqs* 系のシグナル分子が，(*R*)-methyl-3-hydroxymyristate（3-OH MAME）と(*S*)-3-hydroxypentadecan-4-one（C_{15}-AHK）であることを報告した。今回はシグナル分子合成酵素欠損株および相補株を作製し，各株の swimming motility 活性，biofilm 形成能を評価したので報告する。
【方法と結果】はじめに，各 QS の機能を調べるために *C. taiwanensis* LMG19424 株の QS シグナル分子合成酵素をコードする遺伝子 *phcB* と *tqsA* の欠損株を作製した。*phcB*，*tqsA* 遺伝子の上流領域と下流領域をそれぞれクローニングした pK18mobsacB を *E. coli* S17-1(λ*pir*) 株に導入し，LMG19424 株との接合を経て，Δ*phcB* 株，Δ*tqsA* 株およびΔ*phcB*Δ*tqsA* 株を作製した。作製した欠損株の swimming motility 活性を評価したところ，すべての欠損株において活性が WT に比べ低下していた。また，biofilm 形成能の評価も行った結果，Δ*phcB* 株とΔ*phcB*Δ*tqsA* 株において有意に biofilm 形成能が上昇することが明らかとなった。さらに， 3-OH MAME と C_{15}-AHK を添加した培地にて，各欠損株の swimming motility 活性と biofilm 形成能を評価したところ，シグナル分子の濃度依存的にいずれの活性も回復することが明らかとなった。この結果を受けて，*phcB* と *tqsA* の相補株を作製することにした。pK18mobsacB にコードされている *npt Ⅱ*遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域を組み込んだ pBluescript KS(+) に *tqsA* 遺伝子を導入し，遺伝子相補用ベクターを構築した。それを Δ*tqsA* 株に導入することで，*tqsA* 相補株を作製した。*phcB* 相補株においては，欠損株と同様の手順で作製した。作製した各相補株の swimming motility 活性と biofilm 形成能の評価を行ったところそれぞれの活性が有意に回復しており，*phc* QS と *tqs* QS が swimming motility と biofilm 形成を制御していることが明らかとなった。現在，オジギソウへの感染実験を進めており，各株の根粒形成能の評価を行っている。

Cupriavidus taiwanensis, rhizobia, quorum sensing

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A19a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A19 会場

イネ（*Oryza sativa*）に対する酢酸処理による乾燥耐性付与に伴う代謝変化
Metabolic changes associated with acquisition of drought tolerance by acetic acid in rice plants
○伊左治 俊策[1]、吉永 直子[1]、土生 芳樹[2]、森 直樹[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]農研機構）
○Shunsaku ISAJI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoshiki HABU[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NARO)

【背景と目的】
高温, 凍結など非生物的ストレスにさらされると, 植物は様々な遺伝子発現を変化させて, ストレスに対応する. 近年, シロイヌナズナで乾燥ストレスに応答し酢酸を生合成する遺伝子が同定された. また, 演者の一人は酢酸で処理したイネ (*Oryza sativa*) に, 乾燥耐性が付与されることも見出した (Kim *et al.*, 2017). 昨年度の本大会において, 酢酸処理したイネで 4 - アミノ酪酸 (GABA) の蓄積量が地上部と根の両方で有意に増加し, その蓄積するタイミングが異なることを演者らは示した. 本研究では, 処理した酢酸がイネでどのように代謝されているか調べた.

【方法と結果】
播種後 2 週間生育させたイネ (日本晴) を水道水 (対照区) または酢酸水溶液 (30 mM, 処理区) で 4 日間生育させた. その後 4 日間乾燥ストレスを与え, 5 日間再吸水させたところ, 処理区では対照区に対し生存率が高かった.
処理した酢酸のイネ体内における代謝を明らかにするため, ^{13}C 標識した酢酸でイネを処理し, トリカルボン酸 (TCA) 回路周辺のアミノ酸・有機酸の ^{13}C ラベル化率を調べた. その結果, アセチル CoA より下流の代謝物のみが ^{13}C で標識された. さらに, ^{13}C 標識酢酸で処理したイネ根抽出液の ^{13}C-NMR スペクトルから, GABA はグルタミン酸から glutamic acid decarboxylase (GAD) によって生合成されると示唆された. 以上から, 酢酸処理したイネでは, 酢酸は体内に取り込まれアセチル CoA を経由し GAD によって GABA に代謝されると考えられる. 現在, GABA の蓄積と乾燥耐性の関連に着目し, 実験を進めている.

【参考文献】
J-M.Kim, *et al*. (2017) "Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants." *Nature Plants* **3**(7) nplants201797.

GABA, *Oryza sativa*, drought tolerance

発表責任者：伊左治俊策（isaji.shunsaku@gmail.com）

講演番号：2A19a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A19 会場

ビール酵母由来の多糖によるイネ（*Oryza Sativa*）の根張り向上効果とイオン吸収能の変化

Effects of Beer Yeast Polysaccharides on the Root Growth Enhancement and Ion Absorption of Rice

○持田 真歩、中道 貴也、森田 智也、吉永 直子、落合 久美子、小林 優、奥本 裕、寺石 政義、森 直樹（京大農）
○Maho MOCHIDA, Takaya NAKAMICHI, Tomoya MORITA, Naoko YOSHINAGA, Kumiko OCHIAI, Masaru KOBAYASHI, Yutaka OKUMOTO, Masayoshi TERAISHI, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】
多糖類は植物に対して様々な生理活性を示す．イネでは chitosan や alginate で灌水処理すると，根の伸長に関与する indole-3-acetic acid（以下 IAA）が増加し，根張りが向上する．さらに，ビール酵母の細胞壁由来である β-1,3/1,6-グルカン（以下 CW1）を処理したイネで根張りが向上することを我々は確認している．また，SCOS（= Sulfated chitooligosaccharides）や alginate は 過剰なイオンストレスを緩和すると知られている．本研究では，CW1 にも同様の効果があるか軽金属・重金属イオンの両方を用いて検証した．

【方法・結果】
第 4 葉が完全に展開したイネをグルカン相当 50 ppm の CW1 水溶液で 1 週間栽培したところ，根張りの向上が観察された．
また，コントロール区と CW1 処理区に軽金属のナトリウム・マグネシウム・アルミニウムイオンを過剰に添加して栽培したところ，コントロール区では過剰な軽金属による根張りの抑制が認められたが，CW1 処理区では軽金属の過剰害が緩和された．一方，CW1 水溶液に重金属の亜鉛・カドミウムイオンを過剰に添加した処理区では，軽金属と逆の結果になった．また，地上部ではクロロシスが観察された．CW1 処理によってより多くの亜鉛・カドミウムイオンが吸収され，植物体中の亜鉛・カドミウム量が増加したために生育阻害を受け，クロロシスが観察されたと予想した．原子吸光分析装置を用いて植物体中の亜鉛・カドミウム量を測定すると，CW1 処理区で亜鉛・カドミウム量が増加していた．CW1 処理により，重金属イオンの吸収能が変化したと示唆された．

rice, polysaccharides, heavy metals

発表責任者：持田真歩（mochida.maho.52c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A19a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A19 会場

インドネシアのハリナシバチが生産するプロポリスの化学的研究
Components and biological activities of propolis from Indonesian stingless bee

○宮田 椋[1]、Muhamad Sahlan[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県立大食品栄養、[2]インドネシア大)
○ Ryo MIYATA[1], Muhamad SAHLAN[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]University of Indonesia)

【目的】

プロポリスとは、ミツバチ(*Apis melifera*)が植物の新芽や樹皮から採集した樹脂状物質を巣箱の隙間に塗布したものであり、日本では健康食品の素材などに利用されている。今回、ハリナシバチが生産するプロポリスを研究対象とした。ハリナシバチとは文字通り毒針を持たないミツバチであり、インドネシアやタイをはじめとする熱帯地域に生息している。ハリナシバチのプロポリスは、セイヨウミツバチ(*Apis melifera*)のものとは異なり、巣箱の隙間に塗布された樹脂状物質だけでなく、巣全体でプロポリスと称されることが多い。セイヨウミツバチのプロポリスに関する研究は数多く報告されているが、ハリナシバチ由来のプロポリスの成分分析および機能性評価に関しては、研究の報告が非常に少ないのが現状である。

そこで本研究では、インドネシアのハリナシバチ(*Tetragonula biroi*)が生産するプロポリスの成分分析および機能性評価を行うことで、ハリナシバチ由来のプロポリスの機能性を見出すことを目的とした。

【方法】

インドネシアで採集したハリナシバチ(*Tetragonula biroi*)のプロポリスを 70% エタノールで抽出し、ヘキサン、酢酸エチル、水で分配した。ヘキサン抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて 17 個のフラクションに分画し、分取 HPLC にて含有化合物の単離・精製を行った。その後、精製した化合物を MS、NMR など各種分析機器を用いて構造解析を行った。

また、インドネシア産ハリナシバチ由来のプロポリス 70% エタノール抽出物に対して、DPPH 法による抗酸化活性、ペーパーディスク法による抗菌活性を評価した。

【結果】

ヘキサン抽出画分からプレニルフラボノイド類をはじめとする 7 種類の既知化合物、3 種類の新規化合物を単離・同定した。インドネシア産ハリナシバチ由来のプロポリスの 70% エタノール抽出物は他地域で採取したセイヨウミツバチのプロポリスと比較して、抗酸化活性、抗菌活性共に弱い活性を示した。

stingless bee, *Tetragonula biroi*, propolis

発表責任者：熊澤茂則（kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A19a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A19 会場

タイのハリナシバチが生産するプロポリスの化学的研究
Component analysis and functional evaluation of Thailand stingless bee propolis
○石津 英里子[1]、BOONYADIST Vongsak[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県立大学、[2]Burapha University)
○Eriko ISHIZU[1], Vongsak BOONYADIST[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Burapha University)

【背景・目的】
プロポリス(propolis)は、ミツバチが植物の新芽や樹脂状物質を巣内に蓄えたものであり、様々な生理作用を持つことが知られている。ミツバチは、巣の周辺に生育する植物の中からプロポリスの材料となる植物（起源植物）を選定するため、プロポリスの形態、成分、生理活性は採取地域によって異なる。タイやインドネシアをはじめとする世界の熱帯地域では、ハリナシバチと呼ばれる体長 5 mm 程度の毒針を持たないミツバチが存在する。ハリナシバチもプロポリスを生産するが、その成分や機能性についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、タイのハリナシバチが生産するプロポリスについて、成分分析や機能性評価を行い、その利用価値を見出すことを目的とした。
【方法】
(1) タイのチャンタブリーで採取されたプロポリスを 70%エタノールで抽出し、得られた抽出物について DPPH 法を用いた抗酸化活性試験を行った。比較対象として、沖縄産、ブラジル産、ウルグアイ産のセイヨウミツバチのプロポリスを用いた。これらのプロポリスの起源植物はそれぞれ異なる。また、ペーパーディスク法による抗菌活性試験も行った。
(2) プロポリスの 70%エタノール抽出物をヘキサン、酢酸エチル、水の順で分配し、得られた酢酸エチル抽出物をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーに供し粗分画を行った。収量の多い画分について、分取 HPLC を用いて成分の単離・同定を行った。
(3) 東南アジア原産の果物であるマンゴスチンがタイのハリナシバチの養蜂場で栽培されている。マンゴスチンの果皮表面からにじみ出る黄色い樹脂がプロポリスの起源である可能性が考えられたため、この樹脂を採取し 70%エタノールで抽出した。得られた抽出物を、HPLC や LC-MS を用いて測定し、プロポリスの抽出物と比較した。
【結果】
(1) 抗酸化活性試験の結果より、タイのプロポリスは比較対象としたプロポリスよりも弱い抗酸化活性を示した。また、黄色ブドウ球菌に対して弱い抗菌活性を示した。
(2) 酢酸エチル層から α-マンゴスチンをはじめとする数種のキサントン誘導体を単離・同定した。詳細な成分分析結果は当日報告する。
(3) 分析結果から、プロポリスの起源はマンゴスチン果皮表面の樹脂である可能性が示唆された。

Propolis, Stingless bee, Xanthone

発表責任者：熊澤 茂則（kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A19a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A19 会場

匂い可視化技術の開発

Development of odor visualization technology

○亀山 裕、矢吹 雅之、井上 道晶（花王株式会社）
○Yutaka KAMEYAMA, Masayuki YABUKI, Michiaki INOUE (Kao Corporation)

悪い匂い（悪臭）は人を不快にし、良い匂い（芳香）は人に安らぎを与える。匂い環境の制御は毎日を快適に過ごす上で極めて重要である。一方、匂いのある物質は数十万種類とも言われ、また、ppb～ppt レベルの極めて低濃度で存在しており、さらに、匂いの感じ方には個人差がある。従って、微量の匂い物質を網羅的かつ客観的に分析・評価できる技術が必要である。今回、効率的な濃縮技術と機器分析、コンピュータ処理によって匂い物質の種類と量を正確に可視化する技術を開発した。本技術を用いれば、キーとなる超微量の匂い物質がどの場所にどの位存在しているか（分布情報）、また経時での変化等を視覚的に捉えることができる。

visualization, odor, sole

講演番号：2A19a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A19 会場

画像解析を用いたダイズのハスモンヨトウ食害抵抗性因子の探索

The investigation of the resistant factor against *Spodoptera litura* feeding in soybean by image analysis

○中田 隆[1]、手嶋 伸[1]、吉永 直子[1]、寺石 政義[1]、Eric SCHMELZ[2]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校)
○ Ryu NAKATA[1], Shin TEJIMA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Masayoshi TERAISHI[1], Eric SCHMELZ[2], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]UCSD)

【背景・目的】

「ダイズが持つハスモンヨトウ食害抵抗性因子の迅速かつ簡便な定量解析法の開発とその応用」

重要作物であるダイズ (*Glycine max*) は，ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫の食害により深刻な被害を受ける．しかし，ダイズには食害されにくい抵抗性品種があり，育種への利用など植物保護技術への応用が期待されている．

しかしながら，これまで食害抵抗性のメカニズムの詳細は明らかになっていない．本研究では，ダイズが持つハスモンヨトウに「食べられにくい」抵抗性に寄与する因子の解明を目的とした．特に，ダイズ葉表面の毛茸 (trichome) は抵抗性の一因と考えられており，その機能に注目した．

【方法・結果】

画像解析による食害量の経時定量解析



ハスモンヨトウに食べられにくい抵抗性品種「ヒメシラズ」・「IAC100」と感受性品種「エンレイ」・「タマホマレ」を用い，画像解析による食害量の経時定量解析法を確立した．本手法では，円形に切り抜いた葉を貼り付けた 24 穴プレートに 2 齢幼虫を入れ，葉が食害される様子を 30 秒に 1 回の間隔で撮影した．この画像を Open CV ライブラリーを用いたアルゴリズムにより解析し食害面積を定量した．これにより，**「ヒメシラズ」・「IAC100」は「エンレイ」・「タマホマレ」より有意に食べられにくいことが 30 分以内で定量評価できた**．

食害抵抗性因子の探索

「ヒメシラズ」・「IAC100」の毛茸を剃刀で除去しても食害量は同等であった．そこで，食害などで毛茸が傷付くことで毛茸内容物が滲出し食害阻害効果を発揮すると予想し，毛茸内の成分に注目した．毛茸内の成分を LC-MS で分析した結果，「ヒメシラズ」・「IAC100」の毛茸に 3 種類のフラボノール配糖体が多く含まれていた．これらの混合物をダイズ葉に塗布し，食害阻害効果を評価したところ，混合物の濃度依存的に食害量が減少した．これにより，**抵抗性品種の毛茸に多く含まれるフラボノール配糖体が食害抵抗性に寄与すると考えられた**．

soybean, *Spodoptera litura*, image analysis

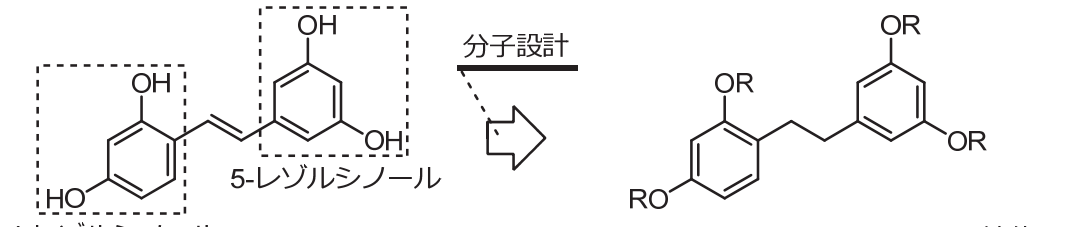
講演番号：2A19p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A19 会場

ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の化学合成とチロシナーゼ阻害活性

Chemical synthesis of dihydrooxyresveratrol and their tyrosinase inhibitory activity

○田中 優理、鈴木 茉莉那、小太刀 悠佳、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Yuri TANAKA, Marina SUZUKI, Yuka KODACHI, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

マルベリー(*Morus alba*)から単離・構造決定されたオキシレスベラトロール(**1**)は，強力なチロシナーゼ阻害活性を示すスチルベン型ポリフェノールである．しかしながら，スチルベン類は一般的に，光に対して不安定で水に溶けにくい性質を持っている．そこでより安定な親水性チロシナーゼ阻害剤の新規開発を目指し，**1** をリード分子としてグルコシド構造を有するジヒドロオキシレスベラトロール配糖体 **2-5** の分子設計を行った．また，Appel 反応，Wittig 反応および Schmidt 配糖体化反応を鍵段階に用いて，それらの化学合成を計画した．



オキシレスベラトロール(**1**)
(光に不安定，水に溶けにくい，**高活性**)

ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体**2-5**:
Rにグルコースが一つもしくは二つ結合
(**光に安定**，**水溶性**，**高活性**)

水酸基の保護，ヒドリド還元，塩素化およびホスホニウム塩の調製により，3,5-ジヒドロキシベンズアルデヒドから Wittig 試薬を合成した．また，2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドに保護基を導入し，Wittig 反応の原料であるアルデヒドを得た．以上の 2 つの化学種を用いて，Wittig 反応を行い，非対称スチルベンを合成した．得られたスチルベンの二重結合を，パラジウムエチレンジアミン錯体を用いた水素添加反応により還元し，**2-5** のアグリコン部分に相当するジヒドロオキシレスベラトロールへと導いた．

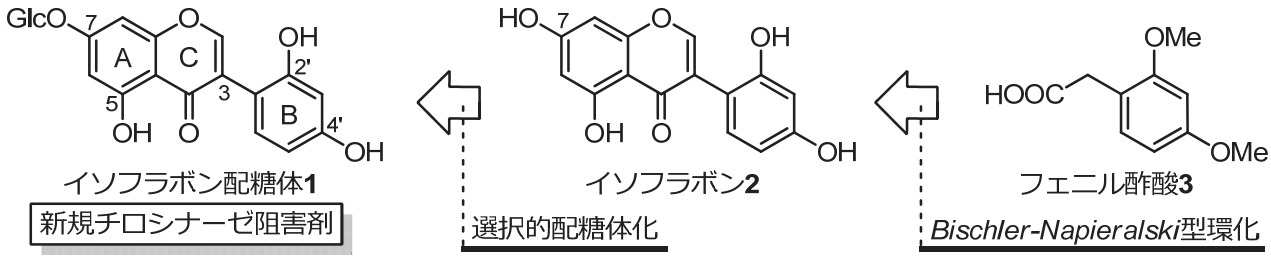
得られたレスベラトロールの 4-レゾルシノール部分，もしくは 5-レゾルシノール部分の保護基を選択的に除去した後，グルコース供与体としてトリクロロアセトイミデートを用い，Schmidt 配糖体化反応を行った．その結果，ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の保護体が得られた．最後に，加水素分解とエステル交換により全ての保護基を除去し，目的とするジヒドロオキシレスベラトロール配糖体 **2-5** の化学合成を達成した．また，それらのチロシナーゼ阻害活性についての知見が得られた．

dihydrooxyresveratrol, tyrosinase inhibitor, glycosylation

講演番号：2A19p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A19 会場

アピオスイソフラボン配糖体の全合成とそのチロシナーゼ阻害活性
Total synthesis of apios isoflavone glycoside and its tyrosinase inhibitory activity
○馬酔木 奈々、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Nana ASEBI, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

アピオス(アメリカホド，*Apios americana*)は，主に北東北地方で栽培されているマメ科の作物である．この食用塊茎より，2013 年，イソフラボン配糖体 **1** が単離・構造決定された．このイソフラボンは，B 環部にレゾルシノール構造を有しており，以前，当研究室で開発された強力なチロシナーゼ阻害剤であるビベンジル配糖体のアナログとして位置付けられる．しかしながら，**1** の全合成およびチロシナーゼ阻害活性に関する研究は，現在まで行われていない．そこで本研究では，Bischler-Napieralski 型環化反応および配糖体化反応を鍵段階として，**1** の全合成に取り組み，合成中間体であるイソフラボン **2** とともに，チロシナーゼ阻害活性の評価を行った．



ルイス酸存在下，1,3,5-トリメトキシベンゼンとフェニル酢酸 **3** との Friedel-Crafts 型カップリングを行い，アセトフェノンを得た．*N,N*-ジメチルホルムアミドジメチルアセタールを増炭剤として，得られたアセトフェノンの Bischler-Napieralski 型環化反応を行い，イソフラボン **2** の保護体を合成した．保護体の全てのメチル基を三臭化ホウ素処理により除去し，**1** のアグリコンであるイソフラボン **2** を得た．このイソフラボンに対して，相関移動触媒存在下，配糖体化反応を行い，7 位のみが選択的にグリコシル化された配糖体を合成した．最後に，全ての保護基を除去し，アピオス由来のイソフラボン配糖体 **1** の全合成を初めて達成した．

次に **1** とそのアグリコンである **2** のチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．イソフラボン **2** では，濃度を 1 mM まで上昇させても IC_{50} は求められなかった．しかしながら，イソフラボン配糖体 **1** の IC_{50} は 399 μM と算出され，その値は，フラボノイドの中で比較的強いチロシナーゼ阻害活性を有するモリンよりも小さかった．このように **1** は，アピオス由来の新規チロシナーゼ阻害剤であることが明らかになった．また **1** と **2** の活性差は，配糖体化などによるイソフラボン 7 位の化学修飾が，チロシナーゼ阻害活性の向上に寄与することを強く示唆している．

apios, isoflavone, tyrosinase inhibitor

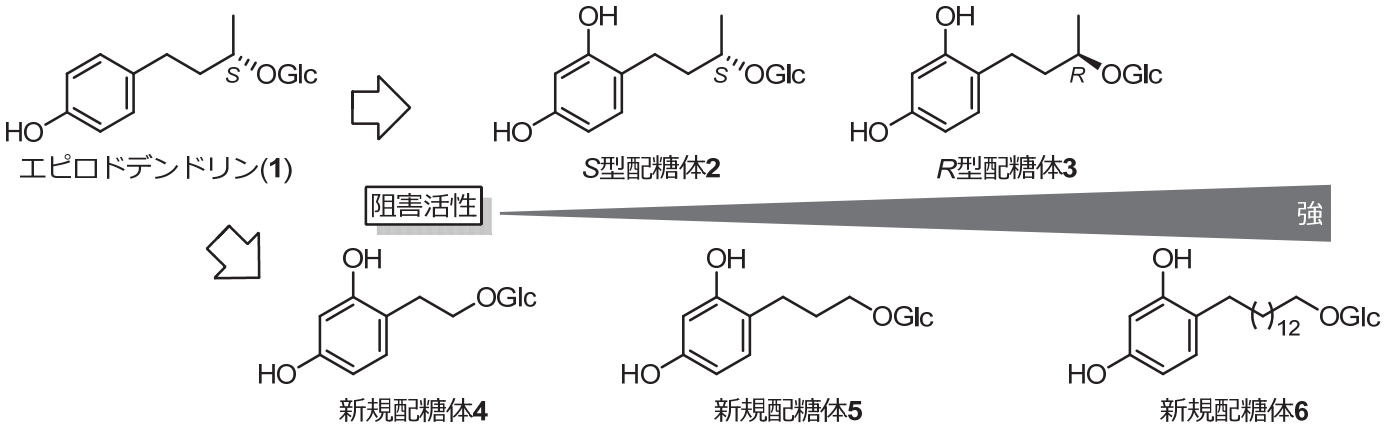
講演番号：2A19p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A19 会場

エピロドデンドリンをリード分子とした新しいチロシナーゼ阻害剤の化学的探索

Chemical research of novel tyrosinase inhibitor based on epirhododendrin as a lead molecule

○石岡 和佳奈[1]、大貫 沙弥香[1]、岩舘 丈央[2]、二瓶 賢一[1,2] ([1]宇都宮大農、[2]農工大院連農)
○Wakana ISHIOKA[1], Sayaka OONUKI[1], Takehiro IWADATE[2], Ken-ichi NIHEI[1,2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]TAT)

エピロドデンドリン(**1**)は，民間薬として使用されているメグスリノキ(*Acer nikoense*)に含まれるフェニルブタノリドである．当研究室では，その構造に着目して構造変換を行うことで，皮膚光老化の原因酵素の一つであるチロシナーゼに対する新しい阻害剤 **2** と **3** を開発した．それらの特徴は，代表的なチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸の 2-4 倍の活性を示すことおよび，*R* 型配糖体 **3** が *S* 型配糖体 **2** よりも強い阻害活性を持つことである．特に，後者の立体認識性は，糖構造の存在により発揮されることが分かっている．本研究では，糖が結合しているオキシメチンの立体化学および炭素鎖の長さと，阻害活性との関連性を明らかにするため，アキラルなアグリコン部分を有する配糖体 **4-6** を化学合成し，それらのチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．



出発物質である 2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基に保護基を導入し，Wittig 反応を鍵反応として，炭素鎖数を 2，3 および 14 まで増炭した．それらを還元してアルコールへと導き，Koenigs-Knorr 反応によって配糖体化を行った．最後にすべての保護基を除去し，新規配糖体 **4-6** の化学合成を達成した(総収率それぞれ，52%，45%および 13%)．

チロシナーゼ阻害活性の評価を行ったところ，**5** は 3.5 μM の IC_{50} 値を示し，その活性は **2** と **3** の中間に位置した．したがって，オキシメチンの立体化学が活性に影響していることが明確になった．また，**5** と比較すると，**4** は約 0.11 倍および **6** は約 10 倍の活性を示し，ベンゼン環と糖の間の炭素鎖の伸長により，強力なチロシナーゼ阻害剤が開発できることが示された．

tyrosinase inhibitor, epirhododendrin, glycosylation

講演番号：2A19p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A19 会場

スチルベン類の合成及び構造活性相関に関する研究
Synthesis of stilbenes and there structure activity relationship
○阿部 圭祐[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Keisuke ABE[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】当研究室では、継続的にスチルベノイドの系統的合成を行い、その構造活性相関について検討している。中村らは、スチルベンを構成する二つのベンゼン環にメトキシル基を導入した種々のスチルベノイドを合成した。メトキシル基の置換様式と生物活性の関係について検討したところ、Z 体の方が E 体より強い活性を示すこと、全メトキシル基数が 4 個のものの方が 2 個のものより強い活性を示すこと、各ベンゼン環に置換するメトキシル基数は 1 個の場合よりも 2 個の方が強い活性を示すことを報告している。Z 体では二つのベンゼン環が同一平面上に配置できないため非平面形状であるのに対し、E 体ではベンゼン環同士の相互作用が発生しないため平面形状をとることが、両者の活性の違いに影響したと推察している。

さらに各ベンゼン環に 2 個ずつメトキシル基が置換した Z 体スチルベノイドの生物活性を検討したところ、両ベンゼン環に対称にメトキシル基が置換したものは、非対称にメトキシル基が置換したものより強い活性を示すことなど、興味深い傾向が認められた。そこで本研究では、メトキシスチルベノイドの系統的合成を行い、スチルベノイドの構造活性相関研究をより詳細に行うこととした。

【方法】ベンズアルデヒド類をメタノール溶媒中 $NaBH_4$ でヒドリド還元して、フェニルメタノール類とした。これに DCM 溶媒中で PBr_3 を加えて臭素化してブロモメチルベンゼン類を合成した。さらに、これに PPh_3 を加えトルエン溶媒中で反応させることでホスホニウム塩類を調製した。その後、ホスホニウム塩類とベンズアルデヒド類を THF または DMF 溶媒中 *t*-BuOK 存在下で Wittig 反応によりカップリングさせ、シス体とトランス体の混合物としてスチルベノイドを合成した。この混合物よりカラムクロマトグラフィーを用いて両異性体を分離した。合成したスチルベノイドの生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制効果により評価した。

【結果】潮見らは、2－メトキシベンズアルデヒドとベンジルホスホニウム塩の Wittig 反応から Z 体スチルベノイドは生成せず、選択的に E 体スチルベノイドが生成することを報告している。Wittig 反応の遷移状態における立体障害が原因と推察している。本研究では、ベンズアルデヒドと 2－メトキシベンジルホスホニウム塩との Wittig 反応により(Z)-2-メトキシスチルベノイドの合成を試みたが、やはり合成することができなかった。生物試験の結果、一方の芳香環が 3,4,5-トリメトキシフェニル基であるスチルベノイドが顕著な活性を示す傾向が認められた。さらに、一方の芳香環をフェニル基からナフチル基に置換することで活性増強が認められた。

Stilbene, HL-60, Structure activity relationship

講演番号：2A19p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A19 会場

6 位に 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を持つ 5,6-dihydro-α-pyrone の全立体異性体の合成と抗微生物活性

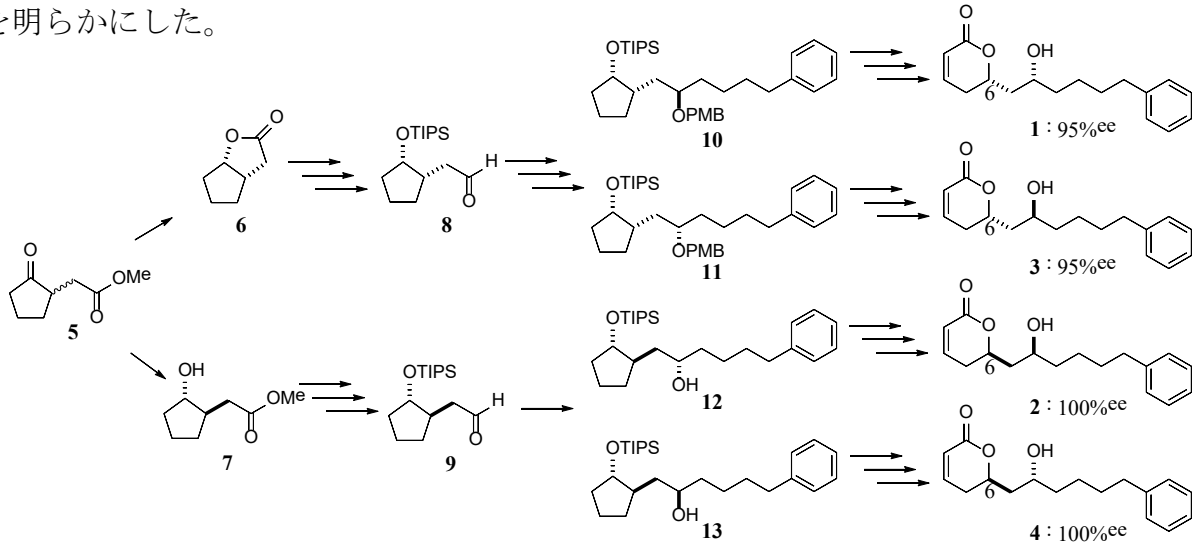
Syntheses and antimicrobial activity of all stereoisomers of 5,6-dihydro-α-pyrone bearing 2-hydroxy-6-phenylhexyl group at 6 position

○越智 良太[1]、秋山 浩一[2]、阿野 嘉孝[1]、西脇 寿[1]、山内 聡[1] ([1]愛媛大院、[2]愛媛大学学術支援センター)

○ Ryouta OCHI[1], Koichi AKIYAMA[2], Yoshitaka ANO[1], Hisashi NISHIWAKI[1], Satoshi YAMAUCHI[1] ([1]Graduate school of agriculture, Ehime Univ., [2]Integrated Center for Sciences, Ehime Univ.)

【目的】6 位に 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を持つ 5,6-dihydro-α-pyrone の全立体異性体 **1-4** を酵母還元生成物 lactone **6**、hydroxyester **7** の立体構造を利用して合成した。さらに、合成した化合物の立体構造が生物活性に与える影響について情報を得るために、今回は、抗微生物活性を評価した。

【結果・方法】ラセミ体の methyl (2-oxocyclopentyl)acetate **5** を酵母還元し、lactone **6** と hydroxyester **7** を得た。lactone **6** から aldehyde **8** を調製し、Grignard 反応を用いて 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を導入した。このとき、ジアステレオマーの分離が行えなかったために、2 級水酸基を PMB 化してからジアステレオマーを分離し、化合物 **10** (46%), **11** (38%) を得た。続いて、脱シリル化の後、シクロペンタノール部位の PCC 酸化、Baeyer-Villiger 酸化を行いラクトン環を構築した。最後に、α,β-不飽和二重結合を導入し、脱 PMB 化を行って立体異性体 **1**, **3** を 95%ee で得た。一方で、hydroxyester **7** からは aldehyde **9** を調製した後、Grignard 反応により 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を導入し、ジアステレオマーの分離を行い、alcohol **12** (38%), **13** (40%) を得た。以下同様にして、立体異性体 **2**, **4** を 100%ee で得た。現在は、立体特異的な合成方法を検討中である。500 μM における植物病原性カビ *Colletotrichum lagenarium* の生長率は、**1** が 48%、**2** が 44%、**3** が 73%、**4** が 65%であった。*Bacillus subtilis* の MIC 値は **2** と **4** で 25 mM だった。*Salmonella choleraesuis* の MIC 値は **4** で 6.3 mM、**1-3** で 12.5 mM であった。**1-4** のガン細胞および昆虫細胞に対する細胞毒性は過去に示したが、今回初めて立体構造と抗微生物活性との関係を明らかにした。

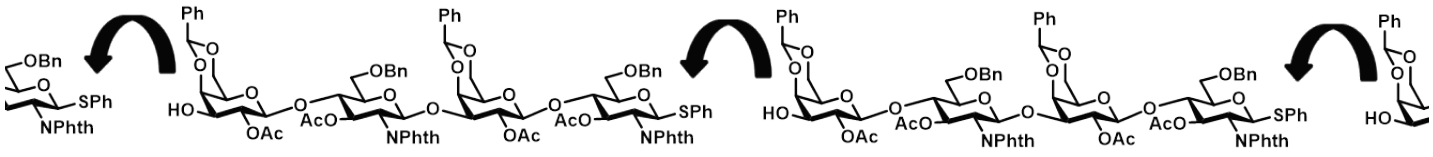


5,6-dihydro-α-pyrone, antimicrobial activity, yeast reduction

講演番号：2A20a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A20 会場

新規迅速多糖合成法によるポリラクトサミンの合成
Rapid synthesis of polylactosamine based on a novel synthetic method
○浅野 拓也[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]([1]岐阜大院・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Takuya ASANO[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【目的】単糖が多数重合した“多糖”には生理活性物質として機能するものが多く存在するが、その生物機能やメカニズムは十分には解明されていない。また、天然に存在する多糖はごく微量成分であることに加え、その構造は微小不均一性を有しているため単離が困難である。従って、多糖の詳細な生理機能の解明には有機合成による研究標品の創出が肝要となる。本研究では、生理活性多糖の化学合成を指向した新規多糖合成法により、ガラクトース（Gal）と *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が β（1→4）結合した *N*-アセチルラクトサミン（LacNAc）を繰り返し構造とした多糖であるポリラクトサミンの合成を目指す。
【方法・結果】ポリラクトサミンを化学合成するにあたり、分子内に脱離基と水酸基を有する四糖ユニットを合成し、それをグリコシル化反応に供することで、一挙に四糖ユニットを複数結合させたポリラクトサミン骨格を構築する迅速的な多糖合成法を立案した。また、その際に多数の副生成物が生じることが予想されるため、構築したポリラクトサミン骨格の精製を容易にすべく、アジド基を含むリンカーを有した五糖を還元末端ユニットとした。まず、四糖ユニットの合成に際し、市販のガラクトースとグルコサミン塩酸塩を出発物質として、ガラクトース供与体、グルコサミン受容体を合成しグリコシル化反応に供することでラクトサミン骨格を合成した。次に、合成したラクトサミン骨格に種々の変換を施しラクトサミン供与体、ラクトサミン受容体へと導いた後、グリコシル化させることにより四糖ユニットの合成を行った。得られた四糖ユニットにアジド基を含むリンカーを導入したガラクトースを結合させて還元末端五糖へと誘導し、先に合成した四糖ユニットとのグリコシル化反応に供することで、現在までに、九糖、十三糖、十七糖のポリラクトサミン骨格の構築、単離に成功した。現在、グリコシル化反応時に生成した二十一糖以上のポリラクトサミン誘導体の単離・精製を試みている。



自己縮合戦略によるポリラクトサミン骨格の迅速合成

polysaccharide, polylactosamine, glycosylation

講演番号：2A20a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A20 会場

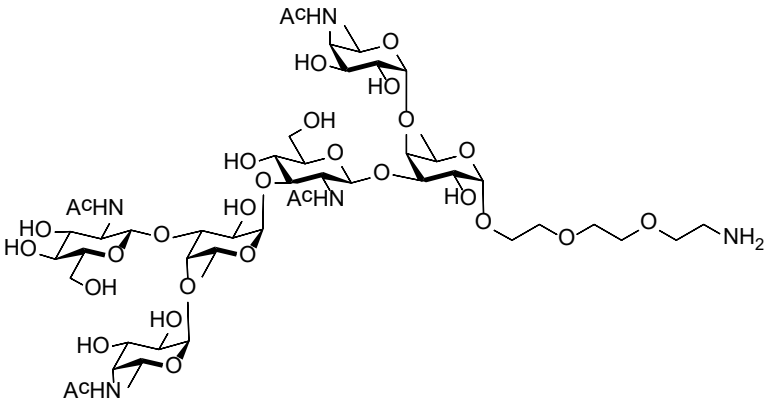
稀少アミノ糖 Fuc4NAc を含む *Stenotorophomonas maltophilia* 由来 O 抗原糖鎖の合成研究

Synthesis study on O-antigen from *Stenotorophomonas maltophilia* containing a rare amino sugar Fuc4NAc

○中田 えりな[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Erina NAKADA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【背景・目的】 グラム陰性菌の細胞外膜には抗原性を有する O 抗原が存在し、これを基にした細菌特異的な抗体の作製など医療分野への応用が期待できる。O 抗原の中には人間の細胞表面には存在しない稀少アミノ糖が構成単位に含まれる場合があり、この糖を含む糖鎖の合成例は乏しく、化学合成の観点からも興味深い標的構造である。本研究では以上の点に着目し、日和見感染の原因菌として近年注目されている *Stenotorophomonas maltophilia* の稀少アミノ糖 Fuc4NAc を含む O3 抗原糖鎖[1)]の化学合成を目的とした。

【方法・結果】 合成標的の還元末端には抗体作製への応用を見据え、キャリアータンパクと結合が可能な一級アミンを有するリンカーを結合させることとした。合成にあたり、繰り返し単位の分岐三糖 GlcNβ(1,3)[Fuc4Nα(1,4)]Fuc をビルディングブロックとし、三糖共通中間体を供与体・受容体へ誘導した後、縮合反応を行う収束的合成経路を立案した。稀少アミノ糖である Fuc4N 供与体の合成は、D-Glc を出発原料とし、4，6 位水酸基が遊離の状態から脱離基の導入・鍵反応となる 6 位の還元と 4 位のアジド化を経て行った。得られた供与体を Fuc 受容体とのグリコシル化反応に供した所、供与体 4 位のアミノ基の保護基が反応性に影響を与えることが明らかとなった。本合成では 4 位アジド体を用いることで、高収率かつ α 選択的に目的の二糖骨格を得る事が出来た。次に、二糖受容体と GlcN 供与体との縮合反応によって得た三糖共通中間体は、脱離基を *N*-フェニルイミデートとした三糖供与体へ誘導後、還元末端側三糖受容体との縮合を行い、立体選択的に六糖骨格を構築した。最終的に骨格の脱保護を行うことで繰り返し単位が二回の目的化合物を得る予定である。



合成標的の化合物
(繰り返し単位二回＋リンカー)

1) A. M. Winn, C. T. Miles, S. G. Wilkinson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *282*, 149-156.

O-antigen, rare amino sugar, chemical synthesis

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A20a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A20 会場

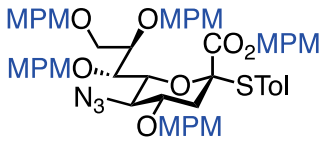
N,N-ジアセチル基を利用した MPM 保護シアリルグリコシドの調製研究

Synthetic study of sialyl glycoside using MPM and *N,N*-diacetyl protection toward glycopeptide synthesis

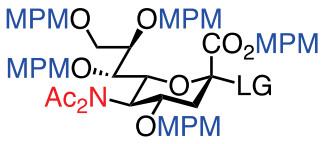
○伊藤 駿、朝比奈 雄也、北條 裕信（阪大蛋白研）
○Shun ITO, Yuya ASAHINA, Hironobu HOJO (Inst. Protein Res.)

糖ペプチド合成は、糖アミノ酸誘導体の合成と、この誘導体を利用した糖ペプチド合成の２つの段階に大別され、これら双方の合成条件を勘案し、適切な糖水酸基の保護基を選択しなければならない。特に、シアル酸含有ペプチドの合成では、極めて酸に不安定なシアリル結合を如何に保持しつつ、完全脱保護ペプチドを得るかが大きな課題となる。前年度大会にて、我々は、トリフルオロ酢酸（TFA）に対して感受性の高い 4-methoxybenzyl (MPM)基と 4-methylbenzyl (MBn)基を利用した新たな保護基戦略によるシアリル糖ペプチドの合成を報告した。この方法では、MPM 保護した Neu5Ac 誘導体 **1** と MBn 保護した GalNAc とのグリコシル化により得られた糖アミノ酸を、糖ペプチドの固相合成に用いた。次に、得られた保護糖ペプチド樹脂を、一般的なペプチドの最終脱保護で用いられる TFA カクテルで処理することによって、シアル酸の欠損を最小限に抑えつつ完全脱保護体を合成することに成功した。しかし、シアル酸 **1** のグリコシル化では、MPM 基が糖受容体水酸基に転位する副反応や、α-選択性の低下など、糖アミノ酸調製時の課題が生じていた。そこで、より複雑なシアル酸含有糖アミノ酸誘導体の合成を指向し、本研究では、MPM 保護シアル酸の効率的α-シアリル化法の検討を行うことにした。

先行研究で生じた MPM 基の転位や、α-選択性の低下の問題を改善するために、より低温でシアリル化反応を温和に進めることのできる高活性なシアル酸誘導体の再設計を行うことにした（下図）。そこで、**1** の 5 位を N_3 基から、*N,N*-ジアセチル基[1]へ変換したシアル酸誘導体 **2** を合成した。ついで種々の基質に対してグリコシル化を行い、極低温下でα-選択性と収率の向上が見られるのかどうか検討した。その結果、収率は中程度ながら、従来の N_3 基では活性化が進行しなかった-78ºC で活性化できることが明らかとなり、MPM 基の転位反応を抑制することに成功した。現在、収率の向上を目指し、活性化条件の検討を進めている。



1



2

LG: Leaving group

[1] Boons, G. J., et al. *J. Org. Chem.* 2001: **66**: 5490-5497.

Glycopeptide synthesis, Sialylation, TFA-labile protecting group

講演番号：2A20a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A20 会場

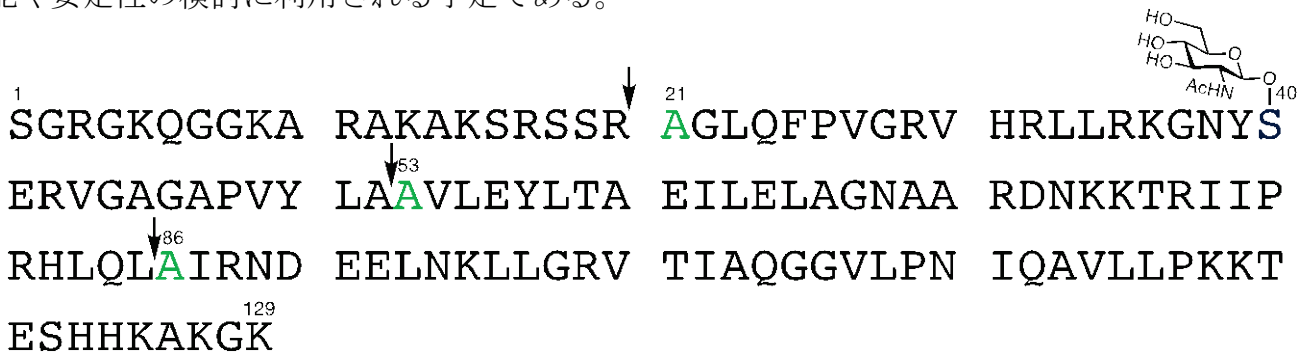
O-beta-*N*-アセチルグルコサミンを持つヒストン H2A の化学合成

Chemical Synthesis of Histone H2A Having *O*-beta-*N*-Acetylglucosamine

○朝比奈 雄也、川上 徹、北條 裕信 (阪大蛋白研)
○Yuya ASAHINA, Toru KAWAKAMI, Hironobu HOJO (Inst. Protein Res. Osaka Univ.)

真核生物の DNA は、ヌクレオソームと呼ばれる DNA-タンパク質複合体の状態で巻き取られ、核内に収納されている。ヒストンは、H2A、H2B、H3、H4 がそれぞれ 2 つずつ集まったオクタマーとして、DNA とヌクレオソームを形成する。ヒストンは、セリン、スレオニン残基のリン酸化や、リシン、アルギニン残基のメチル化などの翻訳後修飾を頻繁に受けることが知られており、この修飾状況にしたがって、ヌクレオソームの構造変化が生じ、様々な遺伝子の転写制御が行われる。これらヒストンの翻訳後修飾の１つとして、セリン、スレオニン側鎖に対する *O*-β-*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）化も報告されている。しかし、可逆的、かつ動的に翻訳後修飾構造が変化する細胞由来から、純粋な修飾構造を持つヒストンを単離することは、極めて困難であり、この糖鎖付加がもたらす転写制御は、未だ不明瞭である。そこで、本研究では、均一な *O*-GlcNAc を持つヒストン H2A の化学合成を行った。

目的化合物、H2A の一次配列を下図に示す。全長配列（１２９残基）を４つのペプチドセグメントに分割して、それぞれ固相法により調製することとした。糖鎖付加部位である Ser^{40} を含むセグメント２は、新たに設計した 4-methylbenzyl（MBn）保護 GlcNAc-Ser 誘導体を合成し、固相法に応用することで調製することにした。その後、前年度大会で報告したワンポットライゲーション法で４つのセグメントを一挙に連結し、望む全長ポリペプチド鎖を構築した。最後に、ライゲーション反応の足場として利用したシステイン残基を、Metal-free 脱硫法により、ネイティブなアラニンへと変換することで、目的の GlcNAc 付きヒストン H2A の全合成に成功した。得られたサンプルは、ヌクレオソーム形成能や安定性の検討に利用される予定である。



ヒストン H2A の全長配列。矢印はライゲーション部位を示す。

4-methylbenzyl (MBn) protection, glycoprotein synthesis, histone

講演番号：2A20a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A20 会場

アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響

Effect of alkyl chain length and glycon moiety on UV absorption of alkylthioglycosides

○伊藤 博[1]、小林 厚志[1,2]、PICHIERRI Fabio[3] ([1]日大工、[2]日大工・工学研究所・生物境界面の機能工学プロジェクト、[3]東北大院工)
○Hiroshi ITOH[1], Atsushi KOBAYASHI[1,2], Fabio PICHIERRI[3] ([1]College of Engineering, Nihon Univ., [2]RIE, College of Engineering, Nihon Univ., [3]Tohoku Univ.)

【研究背景】アルキルチオグリコシドは、アルキル基のアグリコン部位とグリコン部がチオグリコシド結合により繋がった配糖体である。これまで、アルキルチオグリコシドは明確な発色団を持たないため、紫外領域に吸収が無いと考えられていたが、最近、我々はアルキルチオグルコシド(ATG)が 200～240 nm 付近に強い紫外吸収を示すことを明らかにした[1)]。そこで今回、アルキルチオグリコシドのより詳細な紫外吸収特性を明らかにするために、アルキルチオグリコシドのアルキル鎖長もしくはグリコン部位の影響について検討した結果を報告する。

【実験手法】ATG は、アグリコン部位に直鎖のアルキル鎖長を 3~8 とする *n*-alkyl 1-thio-β-D-glucoside (C_nSGlc, n = 3 ~ 8)を既往の方法に従い合成した。分光光度計による測定は、水を溶媒としてそれぞれの濃度を 1.0 mM に調製しておこなった。

【結果と考察】Fig.1 に、ATG (C_3SGlc ~ C_8SGlc)の 200 ~ 240 nm の領域における吸収スペクトルを示す。全ての ATG において、ほぼ同様のスペクトルパターンを示すことが分かった。このことから、ATG

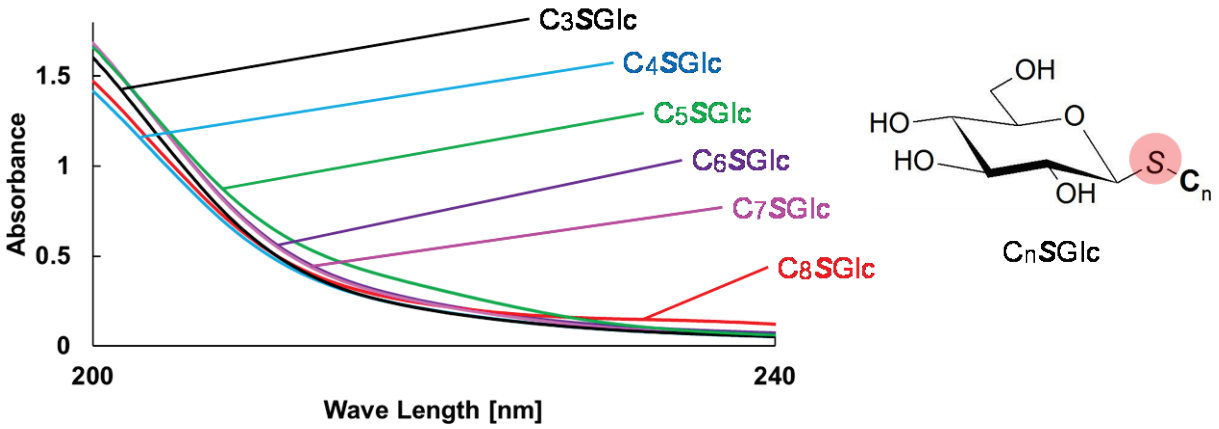


Fig.1 種々の ATG の紫外短波長領域における吸収スペクトル(測定濃度: 1.0 mM 水溶液)

の紫外吸収特性はアグリコン部位の構造に影響されにくいと考えた。また現在、有機化学合成により得たグリコン部位が各種オリゴ糖であるアルキルチオグリコシドにおいても ATG と同様に、紫外吸収特性について詳細な検証を行っており、併せて報告する。

【参考文献】 1) H. Itoh, *et al*., *Tetrahedron Lett*., **58**, 3678-3680 (2017)

alkylthioglycosides, UV absorption, HPLC separation

講演番号：2A20a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A20 会場

リゾチーム活性測定用基質の設計と合成
Molecular design and synthesis of substrates for assaying lysozyme activity
○松井 萌[1]、河野 はるか[1]、松﨑 優香[1]、加藤 優奈[1]、碓氷 泰市[2]、尾形 慎[1] ([1]福島高専・ITS、[2]静岡大)
○Megumi MATSUI[1], Haruka KONO[1], Yuka MATSUZAKI[1], Yuna KATO[1], Taichi USUI[2], Makoto OGATA[1] ([1]NITFC, [2]Sizuoka Univ.)

【背景・目的】

近年我々は、キチンオリゴ糖の還元末端 GlcN 残基の C2 位と C3 位間を選択的に一分子脱水する方法を開発している[1)]。本技術によって、キチンオリゴ糖を簡便な一段階反応でキチンオリゴ糖誘導体「$(GlcN)_nD$」に構造変換することが可能である。今回の研究では、リゾチームに対する新規な活性測定基質を開発する目的で、キトテトラースを出発原料として末端ガラクトシル化キトテトラオース誘導体「$Gal(GlcN)_3D$」の合成を行った。さらに、$Gal(GlcN)_3D$ に対するリゾチームの作用機序をもとにして新たな活性測定基質の設計、合成、評価を試みた。

【方法・結果及び考察】

初めに、出発原料であるキトテトラオースに対して還元末端選択的脱水反応と β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いた非還元末端ガラクトシル化を行うことで、目的物である $Gal(GlcN)_3D$ を収率 5.7%で得た。続いて、$Gal(GlcN)_3D$ に対する HEWL の作用機序を各種実験にて評価した。その結果、$Gal(GlcN)_3D$ はその関連化合物であるキトペンタオースや$(GlcN)_4D$ とは明らかに異なる水解様式を示した。具体的には、HEWL がキトペンタオースや$(GlcN)_4D$ を基質とした際の加水分解は複数の加水分解産物の組み合わせが観察されたのに対し、$Gal(GlcN)_3D$ を基質とした際の加水分解産物は $Gal(GlcN)_2$ と GlcND の組み合わせしか観察されなかった。これにより触媒効率（K_{cat}/K_m）は、キトペンタオースや$(GlcN)_4D$ と比較して約 1.9～1.3 倍向上した。さらに、我々は $Gal(GlcN)_3D$ を基質、β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼを共役酵素として用いることで HEWL の新規活性測定法を開発することに成功した[2)]。つまり、今回合成した $Gal(GlcN)_3D$ は、HEWL のクレフト内に存在する－4 から＋2 と称される糖結合サブサイトのうち－3 から＋2 にしか結合することができないことを意味している。現在、これら $Gal(GlcN)_3D$ の HEWL に対する結合特性をヒントとすることで、加水分解位置を限定しつつ、直接的に発色基質を遊離可能な活性測定基質をドッキングシミュレーションにて設計、合成、評価している最中である。

【参考文献】

1) Ogata M, Takeuchi R, Suzuki A, Hirai H, Usui T. ***Biosci Biotechnol Biochem***. *76*, 1362-1366 (2012).
2) Ogata M, Matsui M, Kono H, Matsuzaki Y, Kato Y, Usui T. ***Anal Biochem***. *538*, 64-70 (2017).

lysozyme, hexosaminidase, enzyme assay

発表責任者：尾形慎（ogata@fukushima-nct.ac.jp）

講演番号：2A20a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A20 会場

新規糖鎖微粒子を用いたウマインフルエンザウイルスの高感度検出
Sensitive detection of equine influenza virus using novel glyco-particulates
○尾形 慎[1]、山中 隆史[2]、相田 玲奈[1]、谷地 赳拓[1]、山内 紀子[1]、大坪 忠宗[3]、池田 潔[3]、加藤 竜也[4]、朴 龍洙[4]、左 一八[5]([1]福島高専・化学バイオ、[2]JRA 総研、[3]広島国際大・薬、[4]静岡大・グリーン科技研、[5]会津大・短)
○Makoto OGATA[1], Takashi YAMANAKA[2], Rena AITA[1], Takehiro YACHI[1], Noriko YAMAUCHI[1], Tadamune OTSUBO[3], Kiyoshi IKEDA[3], Tatsuya KATO[4], Enoch Y. PARK[4], Kazuya I.P.J. HIDARI[5] ([1]NIT Fukushima College, [2]JRA, [3]HIU, [4]Shizuoka Univ., [5]Aizu Univ.)

【目的】

ウマインフルエンザウイルス（EIV）は、ウマの呼吸器細胞表面に存在するウマに特異的な *N*-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）含有シアロ糖鎖に結合することで感染に至る。近年我々は、納豆菌が産生するγ-ポリグルタミン酸を高分子骨格に用いることで、EIV に対して特異的かつ強力に結合可能な Neu5Gc 含有人工糖鎖ポリペプチドの合成に成功している [1)]。本研究では、この Neu5Gc がクラスター化された糖鎖高分子を利用することで EIV を選択的に吸着濃縮可能な新規糖鎖固定化微粒子の合成を目的とした。さらに、本糖鎖微粒子を用いて、実際の実験感染馬から得られた鼻腔スワブ中のウマインフルエンザウイルスを特異的かつ簡便に吸着濃縮可能かを評価した。

【方法・結果】

初めに、平均糖鎖導入率を 20%程度に調製した Neu5Gcα2,3LacNAc 含有人工糖鎖ポリペプチドの残存するカルボキシ基とデシルアミンとを縮合反応することでデシル基の導入を行った。本反応により、ポリペプチド骨格内に EIV に結合親和性を有する糖鎖分子が 20%程度とデシル基が 30%程度の割合で導入された疎水化糖鎖ポリペプチドの合成に成功した。続いて、本疎水化糖鎖ポリペプチドと直径が 1 μm 程度で表面がヘキシル基で覆われた疎水化有機シリカ微粒子とを溶液中で混合することで、微粒子表面上への糖鎖ポリペプチドの固定化を試みた。結果として、本微粒子と糖鎖ポリペプチドとを 30%DMSO 水溶液中で混合するだけで、疎水相互作用に基づく糖鎖ポリペプチドの固定化が可能であった。なお、本糖鎖微粒子の構造確認は、シアル酸結合性レクチンとの相互作用解析や走査型電子顕微鏡観察、物性評価などによって行った。

最後に、実験的に EIV を感染させた 4 頭のウマより経時的に得られた鼻腔スワブを用いて、本糖鎖微粒子による吸着濃縮処理前後の EIV 特異遺伝子量の変化をリアルタイム PCR により評価した。その結果、全頭の感染後の鼻腔スワブにおいて、本処理後では明らかな EIV 特異遺伝子量の増加が見られ、本処理による EIV 検出の感度向上が示唆された。

【参考文献】

1) Ogata M, Koizumi A, Otsubo T, Ikeda K, Sakamoto M, Aita R, Kato T, Park EY, Yamanaka T, Hidari KIPJ. ***Biosci Biotechnol Biochem***. *81*, 1520-1528 (2017).

glyco-particulate, influenza virus, sensitive detection

発表責任者：尾形慎（ogata@fukushima-nct.ac.jp）

講演番号：2A20a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A20 会場

糖転移酵素の基質特異性を利用したムチン型糖ペプチドの Chemoenzymatic 合成

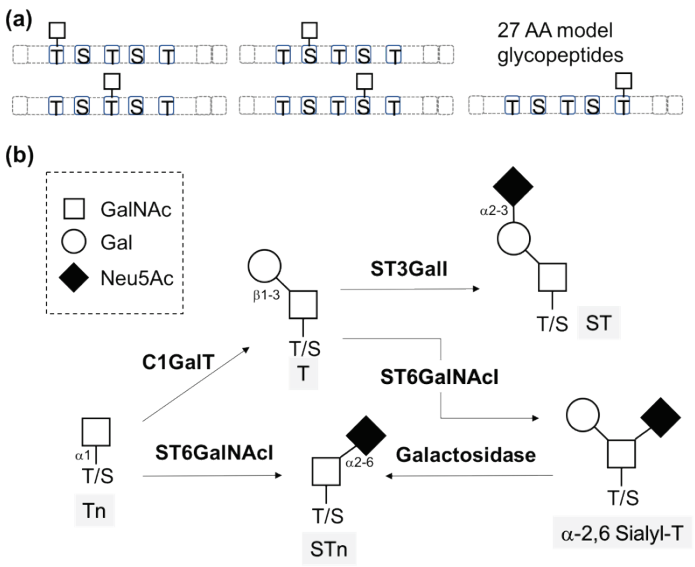
Chemoenzymatic synthesis of mucin-type glycopeptides utilizing substrate specificities of glycosyltransferases

○吉村 弥生[1,2]、高橋 佳江[2]、長島 生[3]、清水 弘樹[3]、岸本 利光[1]、千葉 靖典[2]([1]バイオインダストリー協会（財）、[2]産総研・創薬基盤、[3]産総研・生物プロセス)
○ Yayoi YOSHIMURA[1,2], Yoshie TAKAHASHI[2], Izuru NAGASHIMA[3], Hiroki SHIMIZU[3], Toshimitsu KISHIMOTO[1], Yasunori CHIBA[2] ([1]Japan Bioindustry Association, [2]BRD, AIST, [3]BPRI, AIST)

[目的]ヒト *O*-結合型糖鎖の一つであるムチン型糖鎖はがんを中心した疾患との関連性が確認されており、創薬への利用が期待されている。ムチン型糖鎖の疾患との関連性を解明する上でムチン型糖ペプチドは非常に有用な化合物であるため、その *in vitro* での合成方法は化学法・酵素法両面で研究が進められてきた。我々は Chemoenzymatic に STn [Neu5Ac(α2-6)GalNAc-αThr/Ser]、T [Gal(β1-3)GalNAc-αThr/Ser]、SialylT [Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc-αThr/Ser] 抗原等を提示した糖ペプチドの合成を行っている。本発表では合成を通して確認された糖転移酵素の基質特異性について報告する。

[方法]ベースとなる基質として Thr および Ser 残基が 5 つ点在する 27 残基のペプチドに、GalNAc 分子が 1 分子ずつ修飾された Tn 抗原提示糖ペプチド 5 種を Fmoc 固相合成法により調製した (図 a)。糖転移酵素 3 種 [C1GalT (*Drosophila melanogaster* 由来) 、ST6GalNAcI (*human* 由来) 、ST3GalI (*human* 由来)] はメタノール資化性酵母を用いて分泌タンパク質として発現し精製したものを用いた。

[結果]C1GalT および ST3GalI による糖鎖の伸長反応において Ser または Thr に対する反応性に差はあまり見られなかった。しかし、ST6GalNAcI は GalNAc-αThr 残基と比べ基質中 GalNAc-αSer 残基に対する反応性が低く、ペプチド上での Ser-STn 構造の構築は困難であった。一方、Ser 残基上に T 抗原が導入された糖ペプチドを基質とした場合、シアル酸の転移効率が向上した。ST6GalNAcI を用いた Ser-STn 構造の合成には T 構造を経由した合成経路が有効であることを明らかにした (図 b)。これらの反応を利用して計 24 種類の糖ペプチドライブラリーを作製することに成功した。



[謝辞]本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (糖鎖利用による革新的創薬技術開発) 」の支援によって行われた。

Glycosyltransferase, mucin-type glycopeptide, Chemoenzymatic synthesis

発表責任者：吉村弥生（yoshimura.yayoi@aist.go.jp）

講演番号：2A20a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A20 会場

L,D-ヘプトース含有オリゴ糖の合成研究

Synthetic study of oligosaccharide containing L-*grycero*-D-mannoheptose

○大谷 直輝、一柳 剛（鳥取大農）
○Naoki Ohtani, Ichiyanagi Tsuyoshi (Totter Univ.)

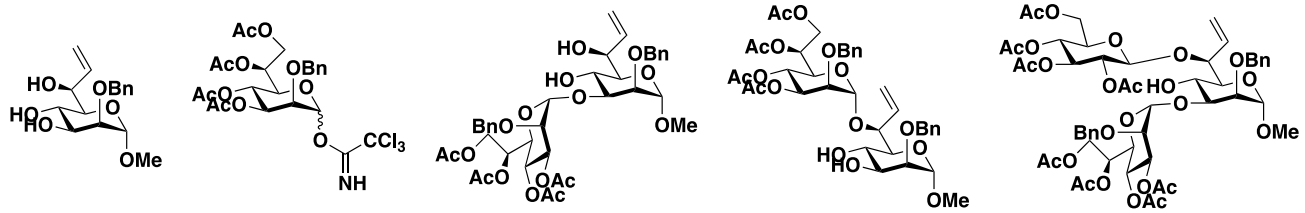
L-グリセロ-D-マンノヘプトース(L,D-Hep)はグラム陰性細菌が細胞外膜に産生する複合糖脂質リポ多糖(LPS)の構成糖である。L,D-Hep は主に LPS のコア糖鎖領域に複数存在し，多様な位置で糖鎖やリン化がされている。我々は LPS のコア糖鎖の合成研究を行っており，結合位置が異なる L,D-Hep 含有糖鎖の合成にも取り組んでいる。これまでに 3,4、および 2,3 分岐構造を有する L,D-Hep 含有オリゴ糖合成を報告している。これら合成過程において，環内と環外 2 級水酸基との反応性の違いに興味がもたれたが，詳細な検討結果が報告されていなかった。本研究では我々が L,D-Hep 合成を行う際のの前駆体であるオクトース誘導体 **1** の 3,4,6 位水酸基のグリコシル化反応における反応性の違いを調査したので報告する。

【方法】

オクトース誘導体 **1** は文献に従い合成した。この化合物 **1** に対し，L,D-Hep イミデート **2** を供与体に用いたグリコシル化反応を行い，得られた生成物を分析することで 3,4,6 位の水酸基の反応性を評価した。また，4,6 位をベンジリデンで保護したのち 3 位に L,D-Hep を導入したのち，ベンジリデン基を除去した誘導体 **3** に対してグルコース供与体の導入を検討し，4,6 位の水酸基の反応性を評価した。

【結果】

3,4,6 位に遊離水酸基を持つ化合物 **1** のグリコシル化の結果，6 位水酸基が反応した 2 糖 **4** が優先して得られ，3 位水酸基よりも反応性が高いことが分かった。また化合物 **3** のグリコシル化反応の結果では，6 位選択的にグリコシル化された 3 糖 **5** が得られた。これらの結果を L,D-Hep 誘導体を受容体に用いた場合と比較した結果と合わせて報告する。



1 **2** **3** **4** **5**

Heptose, LPS, Glycosylation

発表責任者：一柳剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A20a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A20 会場

Kdo 含有糖鎖で修飾した磁気ナノ粒子の作成と機能評価
Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles coated with Kdo-containing oligosaccharide

○一柳 剛、田中 奈央、薮田 行哲（鳥取大農）
○Tsuyoshi Ichiyanagi, Nao Tanaka, Yukinori Yabuta (Totter Univ.)

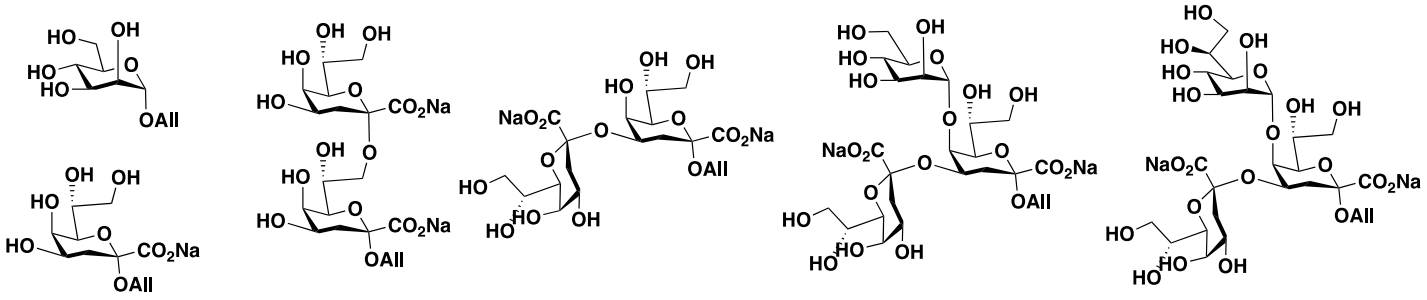
グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質リポ多糖(LPS)を産生する。LPS は O 抗原多糖，コア糖鎖，Lipid A からなり，LPS 認識するヒト抗体およびコア糖鎖部分を認識する抗体の存在が確認されたことより，ワクチンや中和抗体の開発における抗原としての利用が期待されている。我々は，LPS のコア糖鎖の化学的手法による系統的な合成法の開発を行っており，これまでに 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)の合成法およびこれを含むオリゴ糖鎖合成に成功している。本研究では合成糖鎖で修飾した磁気粒子ライブラリを新たに作成し「Kdo を含む糖鎖」を認識するヒト抗体 IgG の選抜を試みた。

【方法】

還元末端にアリル基を有する，Kdo を含む 5 種類の単糖，オリゴ糖誘導体およびマンノースを使用した(下図)。これを光反応によりチオグリコール酸誘導体と付加させたのち，ヒドラジンを介して磁気ビーズに固定化した。この磁気ビーズを使用して市販のヒトイムノグロブリン(IgG)を用いて糖鎖結合抗体の選抜を行った。糖鎖修飾磁気ビーズに結合した抗体をグリシン緩衝溶液で溶離後直ちに中和したのち，タンパク定量およびドットブロット分析により選抜した抗体を検出した。

【結果】

チオグリコール酸の導入は糖鎖の大きさに関係なく高収率で導入可能であった。磁気粒子への糖鎖導入は低収率であったが，導入効率に濃度依存性が見られた。一方糖鎖の大きさと収率との相関は見られなかった。糖鎖修飾磁気粒子による選抜の結果，10 mg の市販のヒト IgG から 3-7 μg 程度の抗体が得られることがわかった。



LPS, magnetic nanoparticles, IgG

発表責任者：一柳　剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A20a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A20 会場

立体特異的 TMS 化反応とそのグリコシド化反応の検討

Investigation of stereospecific trimethylsilylation of anomeric hydroxyl group and it's potential in glycosidation

○浅見 悠里、河口 優香、蟹江 善美、蟹江 治（東海大学）
○Yuri ASAMI, Yuka KAWAGUCHI, Yoshimi KANIE, Osamu KANIE (Tokai Univ.)

糖鎖合成では、位置選択的な保護基の導入とそれらの選択的な脱保護に加え、適切に保護された単糖間のグリコシル化反応が重要である。一般的にグリコシル化反応は、アセタール位に導入した脱離基を活性化して炭素陽イオン種を形成することを基礎とする。この時、環酸素の非共有電子対の隣接効果によって sp2 混成のオキソカルベニウムイオンとなりしばしば S_N1 機構に依存するため、立体選択的なグリコシル化反応は原理的な問題を含んでいる。一方、限定的ではあるがヘミアセタール性水酸基を用いるアルキル化によるグリコシド形成反応も知られている。

本研究では、ガラクトースの 1 位水酸基を TMS エーテルとして保護し、この酸素原子による求核置換反応をモデルケースとして計画した。この際、立体特異的に TMS アセタールを合成できれば新たなグリコシド形成反応への発展が期待できる。まず、β-TMS ガラクトシドの合成を検討した結果、Bn 基で保護した 1 位ヘミアセタール体から TMS-DEA を用いてβ-TMS ガラクトシドを立体特異的かつ高収率で得ることに成功した。一方、α体のみを得ることはできておらず、この立体特異的な合成を検討中である。また、TMS-imidazole を用いる反応では、開環した混合アセタール化合物が形成されることが判明し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製過程で閉環して、α／β-TMS グリコシドの混合物が得られることを見出した。次に、グリコシド形成反応の検討を行った。得られた TMS グリコシドから toluene と KOH の二層溶液中、propargylbromide、TBAF、TBABr、を用いてプロパルギルグリコシドを良好な収率で得ることに成功したが、立体特異性はなかった。また、toluene 溶液中 propargylbromide、KF、18-crown-6 ether、を用いた反応では収率 43%ながらβ選択的にプロパルギルグリコシドを得ることに成功した。

TMSglycoside, propargylglycoside, glycosidation

講演番号：2A20a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A20 会場

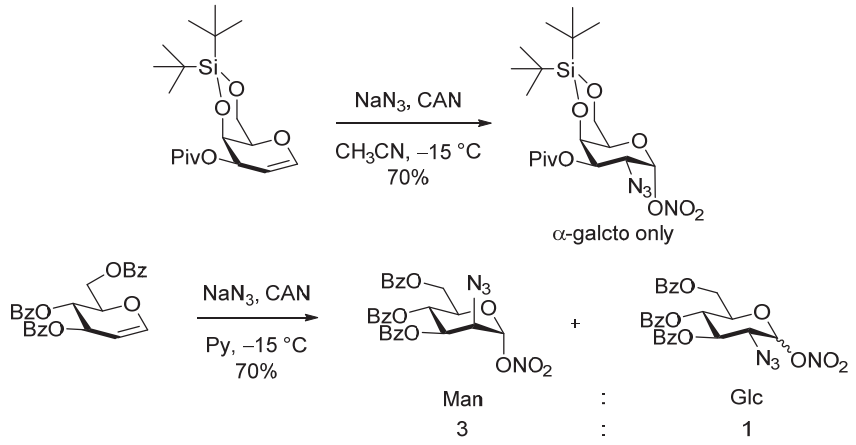
アジドニトロ化における保護基と溶媒の検討

Optimization of protective groups and solvents in azidonitration

○西尾 洋祐[1]、萩原 智男[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大・分子キラリティーセンター)
○Yosuke NISHIO[1], Tomoo HAGIWARA[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Graduate School of Horticulture, Chiba Univ., [2]Molecular Chirality research Center, Chiba Univ.)

糖の 2 位にアジド基を持つ 2-アジド糖は、生細胞表層上の糖鎖を可視化する手法であるメタボリックラベリング法や、α-ガラクトサミンおよびβ-マンノサミン構造を構築する前駆体として用いられるなど糖鎖科学において重要な分子である。一般的に 2-アジド糖は、硝酸アンモニウムセリウム（CAN）とアジド源を用いたアジドニトロ化を対応するグリカールに施すことで調製可能であるが、アジド基が付加する方向によって 4 種類の異性体が生成するため、反応収率が低下したり目的物の分離精製が困難な場合が多い。本研究では、グリカールに対するアジドニトロ化の反応収率と立体選択性を向上させることを目的として、グリカールの保護基やアジド源、反応溶媒について検討した。

電子求引性・供与性、かさ高いといった様々な特性を持つ保護基をガラクタールおよびグルカールに導入し、種々のアジド化剤、反応溶媒および温度下でアジドニトロ化を行った。その結果、非常にかさ高い di-*t*-butylsilylene（DTBS）基で 4,6 位を保護したガラクタールを用いると α-ガラクト型アジド糖のみを与えることを見出した。その一方で、全ての水酸基をベンゾイル基で保護したグルカールに対してピリジン中−15°C でアジドニトロ化を行うと、高いマンノ選択性（Glc : Man = 1 : 3）を発現することを見出した。また添加剤として 2,6-lutidine を加えることで反応時間が短縮され副生成物の生成も抑えられることがわかった。



Carbohydrate, Azidonitration, Stereoselectivity

講演番号：2A20a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A20 会場

o-ホルミルフェニルチオグリコシドによるグリコシル化の反応機構と糖鎖合成への応用

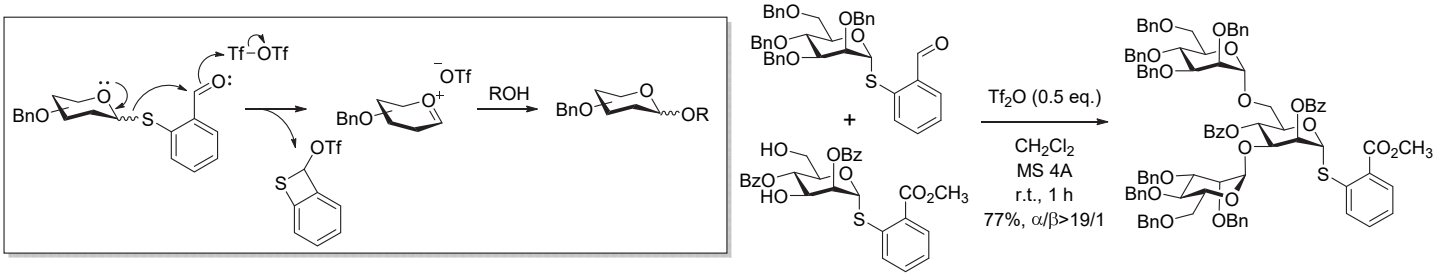
Reaction mechanism of *o*-folmylphenyl thioglycosides in glycosylation and application for oligosaccharide synthesis

○小室 晴香[1]、堺 英俊[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大・分子キラリティー研究センター)

○Haruka KOMURO[1], Hidetoshi SAKAI[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Molecular Chirality Research Center Chiba Univ.)

チオグリコシドは高い安定性を持ち化学選択的に活性化できることから、ハロゲン化糖やイミデート体などと組み合わせて連続的グリコシル化に幅広く用いられている。ゆえに、従来のチオグリコシドに影響を与えずに活性化可能なチオグリコシドは、連続的グリコシル化における新たな building block として期待できる。我々は、脱離基中の *o*-ホルミルフェニルチオグリコシドが通常のチオグリコシドに対して不活性である TMSOTf や Tf_2O により活性化されグリコシル化が進行することを見出した。しかし、副反応として糖受容体の水酸基の TMS 化もしくは Tf 化が起こって反応収率が低下する場合があるため、本法を幅広い糖鎖合成に適用するためには詳細な反応機構を明らかにする必要がある。本研究では *o*-ホルミルフェニルチオグリコシドを用いたグリコシル化の反応メカニズムの解明を目的として、フェニル基の *o* 位に種々の官能基を導入したフェニルチオグリコシドを合成し、これらをグリコシル化に供してその反応挙動を調べた。また、本チオグリコシドを用いてハイマンノース型糖鎖の部分構造を合成した。

フェニル基の *o* 位へアルデヒド基の代わりにヒドロキシメチレン基、カルボキシル基、メトキシメチレン基をそれぞれ導入したフェニルチオグリコシドを調製し、グリコシル化反応を行った。その結果、ヒドロキシメチレン基を導入したものでも反応が進行することがわかった。この結果から、ベンジル位が求電子的になり硫黄原子の付加が起こりやすくなることで反応が促進されることが示唆された。また、電子求引性基を有する糖受容体では水酸基の Tf 化が抑制されて反応収率が大幅に改善されることを見出した。この知見をもとに、マンノースの 2 位と 4 位を電子求引性基であるベンゾイル基で保護した糖受容体に対して *o*-ホルミルフェニルチオマンノシドを作用させたところ、ハイマンノース型糖鎖のコア構造である三糖を高収率かつ高立体選択的に得ることに成功した（77%, α/β>19/1）。



Glycosylation, Thioglycoside, Oligosaccharide

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A20a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A20 会場

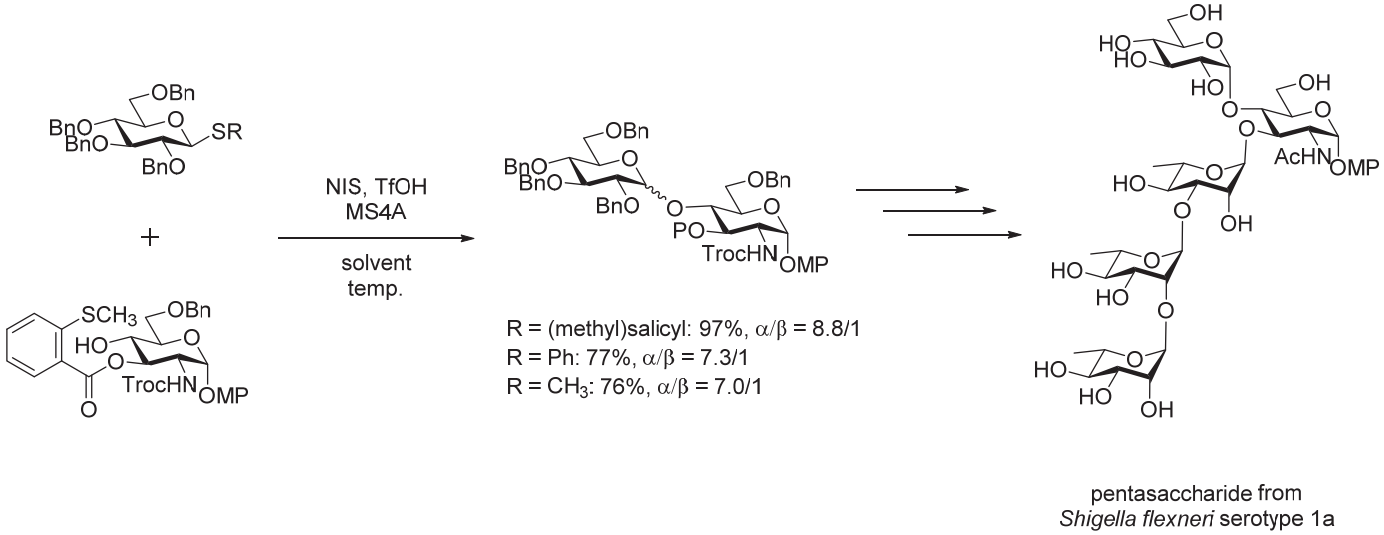
チオエーテル基による 1,2-cis 選択的グリコシル化を用いたオリゴ糖合成

Synthesis of oligosaccharides using thioether-assisted 1,2-cis selective glycosylation

○前川 丈武、須田 栞、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院園芸）
○Hiromu MAEGAWA, Shiori SUDA, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

近年のグリコシル化法の発展により様々なグリコシド結合が形成可能となったが、依然として 1,2-*cis* 型グリコシドの形成は困難を伴う。我々は糖受容体の反応点近傍にメチルチオエーテルを持つ保護基を導入することによって、グリコシル化反応において有意に 1,2-*cis* 選択性を向上させることを報告した。その一方で、1a 血清型 *Shigella flexneri* の細胞表層に発現している O 抗原型多糖は 1,2-*cis* グルコシドを含む 5 糖構造［-3Rhaα1-2Rhaα1-3Rhaα1-3(Glcα1-4)GlcNAcα1-］を繰り返し構造として持ち、この 5 糖ユニットを化学合成することでワクチン開発への展開が期待される。本研究では上記 5 糖ユニットの効率的な構築法の確立を目的として、種々のメチルチオエーテル型保護基を反応点近傍に導入した GlcNAc 型糖受容体を用いた 1,2-*cis* 選択的グルコシル化を検討した。

3 位をチオエーテル型保護基で保護した GlcNAc 誘導体を糖受容体として、様々なグルコース型糖供与体とともに 4-*O*-グルコシル化反応を行った。その結果、3 位に *o*-（メチルチオ）ベンゾイル基を有する糖受容体が最も高い 1,2-*cis* 選択性を示すことがわかった。またチオサリチル酸を脱離基に持つ糖供与体は、チオフェニル基やチオメチル基を持つものに比べて高い 1,2-*cis* 選択性および反応収率を示し（97%, α/β = 8.8/1）、目的とする Glcα1-4GlcNAc 構造を効率的に構築することに成功した。現在 5 糖ユニットの全合成を検討中である。



stereoselective glycosylation, oligosaccharides, *Shigella flexneri*

発表責任者：土肥　博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A20p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A20 会場

N-(L-アラビノフラノシル) ハロアセトアミド両異性体の立体選択的合成
Stereoselective synthesis of α- and β-isomers of *N*-(L-arabinofuranosyl) haloacetamide
○成田 覚[1]、石渡 明弘[2]、伊藤 幸成[2] ([1]芝浦工大院理工、[2]理研)
○Satoru NARITA[1], Akihiro ISHIWATA[2], Yukishige ITO[2] ([1]Grad. School of Eng. and Sci., Shibaura Institute of Technology, [2]RIKEN)

β-L-アラビノオリゴ糖は、植物細胞壁成分であるエクステンシンなどのヒドロキシプロリン (Hyp) リッチ糖タンパク質中の Hyp 残基 に連結した *O*-結合型糖鎖である。ヒトの腸内細菌でビフィズス菌の一種であるビフィドバクテリウム・ロンガムがアラビノオリゴ糖の分解、資化に関与していることが知られているが、最近になってアラビノオリゴ糖を加水分解する酵素群が同細菌より見出された。この酵素群に含まれる β-L-アラビノフラノシダーゼ (β-L-Ara*f*ase) のうち、HypBA1 に注目し [1,2]、すでに *p*-ニトロフェニル β-L-アラビノフラノシド [3]を用いた HypBA1 の反応機構解析をすすめている。HypBA1 の加水分解機構は一般的な糖鎖加水分解酵素とは異なり、２価亜鉛イオンを介したシステイン (Cys) の直接的な関与を含む新規な機構が提唱されている [4,5]。今回、HypBA1 の加水分解機構のより詳細な検証のために、Cys が求核性触媒残基として機能する推定機構を考慮した阻害剤として、アラビノフラノシド (Ara*f*) 誘導体プローブ類の合成を検討したので報告する。

L-Ara*f* 誘導体としてアミドを１位に導入し、ハロアセチル基によるシステイン残基との共有結合形成を指向した非競合阻害剤の合成を計画した。ヘミアセタールのアミノ化により L-Ara*f*アミン誘導体を合成する経路では、二糖体（L-Ara*f*$_2$NH）、三糖体（L-Ara*f*$_3$N） などの生成が起きたため、グリコシルアミンを経由しない経路として、グリコシルアジドを合成中間体として用いることとした。α-L-Ara*f* アジド誘導体より、トリアルキルホスフィンによる Staudinger 反応後、同一反応系内でハロアセトアミド化反応を行なうことで、単糖体の β-L-Ara*f*アミド誘導体が選択的に得られることを見出した。その際アノマー位の異性化を伴ったため、種々反応条件を検討した結果、酸無水物存在下で Staudinger 反応を行なうと、異性化が抑制され α-L-Ara*f* アミド誘導体を選択的に得ることができた。また、di-*t*-butylmethylpyridine の存在下で反応を行うと収率よくα-L-Ara*f*アミド誘導体が得られることも合わせて見いだした。ブロモアセトアミド α-L-Ara*f* の合成はホスホニウム塩が副生したことから低収率のままであったが、クロロアセトアミド体の合成では副生成物である目的物が収率よく得られた。

参考文献： [1] a) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38079; b) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2014**, 10.1074/jbc.M 113.528711 [2] Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 5143; [3] Kaeothip S. et al. *Carbohydr. Res.* **2013**, *382*, 95; [4] Ito, T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *447*, 32; [5] Ito, T. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2014**, *151*, 131.

probes for enzyme, *Bifidobacterium longum*, plant arabinofuranoside

講演番号：2A20p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A20 会場

結核菌アラビナン分解酵素の機能解析に向けたオリゴアラビノフラノシド誘導体の合成研究

Synthetic study on oligoarabinofuranoside derivatives for the functional analysis of mycobacterial arabinan-degradating enzyme

○石渡 明弘、伊藤 幸成（理研）
○Akihiro ISHIWATA, Yukishige ITO (RIKEN)

結核菌などの抗酸菌類に含まれる D-アラビノフラノースからなるアラビナンは、ミコリルアラビノガラクタン-ペプチドグリカン複合体や、リポアラビノマンナンなどの細胞壁成分に含まれる多糖である。α-1,5 結合を主鎖に持ち、α-1,3 結合にて分岐構造となった非還元末端が β-1,2 結合でキャップされた構造をとる。質量分析にて 31 糖まで確認されているアラビナンの合成は、基本的には 1,2-*cis*-β-アラビノフラノシドと 4 分岐構造の構築を達成する必要があり、困難である。既に、β-アラビノフラノシドの高立体選択的合成、分岐オリゴ糖のミコール酸エステルの合成、および、4 分岐 22 糖モチーフの合成を達成している [1–4]。このアラビナンを分解するエンド型加水分解酵素 [5] が見いだされているが、その基質認識や切断部位の解析はこれまで基質の供給が行われていなかったためほとんど進展がなかった。今回、結核菌アラビナン分解酵素解析のための、アラビナン部分構造を有するプローブとして、オリゴアラビノフラノシド誘導体を合成したので報告する。

エンド型加水分解酵素での切断によって生じる還元、非還元末端側の両オリゴ糖フラグメントを質量分析における解析において見分けるための修飾構造として、還元末端残基の 1,2-*O*-アセトニド誘導体を用いることとし、加水分解されうる PNP グリコシド体と合わせて調製する計画とした。オリゴ糖直鎖 α-1,5 結合を有し、直鎖構造及びα-1,3-分岐構造を有するオリゴ糖をアラビナン部分構造を骨格とすることとし、また、エンド型酵素で一般的に考慮されている基質認識に関わるサブサイトを考慮し、オリゴ糖の還元末端側でサブサイト＋１位に対応する残基に 1,2-*O*-アセトニド基を置換した誘導体、及びサブサイト−１位に対応する残基に PNP 基を有する誘導体の合成検討を行った。今回、まず、1,2-*O*-アセトニド体として鎖状、分岐オリゴ糖を合成し、次に、チオグリコシドへ誘導した後に保護基を変換し、グリコシル化により PNP 基を導入するルートを確立した。

参考文献：[1] Ishiwata, A, et al. *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, *14*, 3049. [2] Ishiwata, A, et al. *Org. Lett.* **2006**, *46*, 3521. [3] Ishiwata, A, et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250. [4] Ishiwata, A, Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275. [5] Xin, Y. st al., *et al*., *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 267.

Mycobacterial glycoconjugate, polysaccharide, Enzyme substrate

講演番号：2A20p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A20 会場

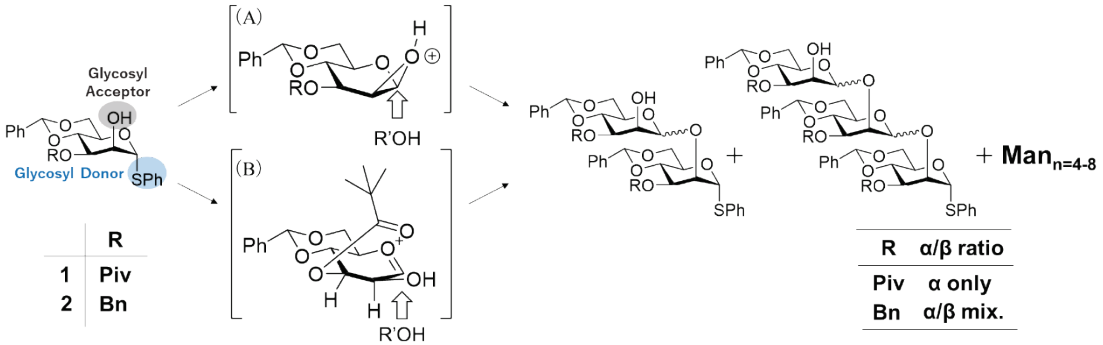
連続的マンノシル化反応における立体選択性の検証

one-pot mannosylation through α-selective manner

○佐野 加苗、小杉 実沙、石井 希実、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Kanae SANO, Misa KOSUGI, Nozomi ISHII, Ichiro MATSUO (Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

目的のオリゴ糖骨格を簡便に得る方法として、グリコシルドナー/アクセプターの両方の役割を担う糖誘導体同士の連続的なカップリング反応を検討している [1]。これまでに我々は、２位に遊離の水酸基を有するマンノース誘導体 **1** の連続的なグリコシル化反応を行い、一段階で α(1-2)結合したオリゴマンノシド２糖から８糖程度の重合度の異なるマンノオリゴ糖が立体選択的に得られ、さらに反応条件によって重合度を制御し、２糖（Manα1-2Man）や 3 糖（Manα1-2Manα1-2Man）が主生成物として得られることを報告してきた。マンノース誘導体 **1** を用いた本反応の高い α 立体選択性は、（A）2 位水酸基の隣接基関与によるエポキシ中間体を経る、もしくは（B）３位水酸基に導入した Piv 基の立体・電子的効果によるものであると推定した。そこで、マンノース誘導体の３位の保護基をベンジル基（Bn）に変えたチオマンノシド誘導体 **2** を用いて連続的なグリコシル化反応を行い、その立体選択性を確認することで、グリコシル化反応における立体選択性に（A）もしくは（B）のどちらの要因が関わっているかが推定できると考えた。

２位にベンジル基を有するマンノース供与体 **2** は、ベンジリデン基で保護したチオマンノシド誘導体の３位に対してスズを用いて選択的にベンジル基を導入することで合成した。得られた **2** を NIS/TfOH 条件下、グリコシル化反応を行なった結果、オリゴマンノシル化反応は進行したものの、複雑な混合物を与えた。得られた２糖および３糖について構造解析をしたところ β 結合を有するオリゴ糖が優先的に生成していることが明らかとなった。このことから、マンノース誘導体 **1** の連続的なグリコシル化反応における立体選択性は、２位水酸基の隣接基関与によるものではなく、３位の Piv 基によって誘起されていると考えている。



[1] 佐野 加苗, 宇津井 隆志, 小杉 実沙, 石井 希実, 松尾 一郎; アスパラギン結合型糖鎖の生合成過程解明を目指した 7 糖の合成; 第 36 回糖質学会年会, P-037.

mannosylation, stereoselective, one-pot glycosylation

講演番号：2A20p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A20 会場

保護基及び溶媒の効果を利用した立体選択的な *O*-結合型糖鎖の合成

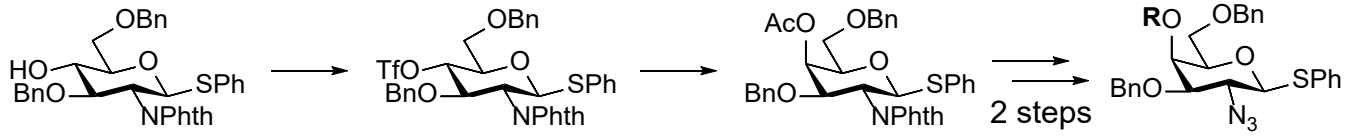
Stereoselective Synthesis of *O*-Glycans Using the Effect of Protecting Group and Solvent

○太田 雄大[1]、白井 彰[2]、松尾 一郎[1,2] ([1]群馬大院・理工、[2]群馬大・理工)
○Yudai Ota[1], Sho Shirai[2], Ichiro Matsuo[1,2] ([1]Grad. School of Sci. Tech., Gunma. Univ., [2]School of Sci. Tech., Gunma Univ.)

細胞の癌化に伴い特徴的に発現する糖鎖は癌関連糖鎖抗原と呼ばれ、癌関連糖鎖抗原によるペプチドワクチン開発研究が展開されている。我々は、癌関連糖鎖抗原に含まれる *O*-結合型糖鎖のコア構造 GalNAc-O-Ser および GalNAc-O-Thr 誘導体のグラムスケールでの合成を目的に研究を行なっている。GalNAc-O-Ser/Thr 構造を化学的に合成するには GalNAc 誘導体と Ser または Thr 誘導体とのグリコシル化において、立体選択的に α 結合を構築することが重要である。そこで我々は、2-アジドガラクトース誘導体の 4 位保護基に着目し、種々の保護基を導入した糖供与体を合成、グリコシル化反応を行うことで、4 位保護基が 1 位の立体選択性に与える影響を検証した。

2-アジドガラクトース誘導体 **1** は、D-グルコサミンから簡便に合成できるグルコサミン誘導体を出発原料に、4 位水酸基の反転、TfN_3 による 2–アミノ基のアジド基への変換を経て 20 g で合成した。得られた **1** の 4 位水酸基に対して、種々の保護基を導入することで 2-アジドガラクトース誘導体 **2**、**3**、**4** を合成した。得られた糖供与体と Ser 誘導体とのカップリング反応を行なった結果、4 位にクロロアセチル（CA）基を持つ **2** および ベンジル（Bn）基を持つ **3** では、ほぼ同様の選択性であった。一方、4 位に tert-ブチルジメチルシリル基（TBDMS）基を有する **4** を用いた場合は、高い α 選択性が得られることが明らかとなった。

以上の結果をもとに、糖供与体 **4** と Z-Ser-OBn および Z-Thr-OBn とグリコシル化反応の立体選択性に反応溶媒が与える影響を検証した。その結果、スレオニン誘導体とのグリコシル化反応では、クロロホルムを溶媒として用いることで高い α 立体選択性（α:β=50:1）で $GalN_3$-O- Thr 誘導体が得られることが明らかとなった。



	R
1	H
2	CA
3	Bn
4	TBDMS

Glycosylation, *O*-glycan, Stereoselectivity

講演番号：2A20p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A20 会場

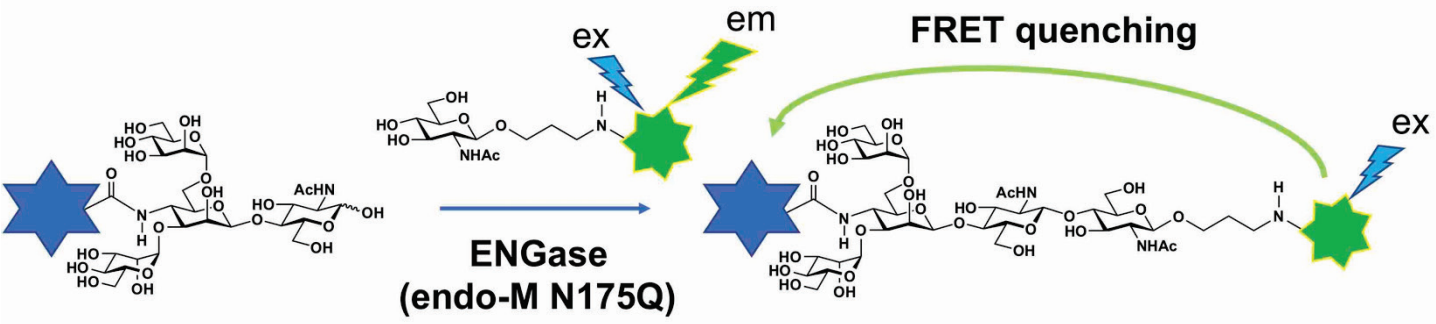
化学修飾糖鎖を用いた ENGase 糖転移反応の追跡

Real-time monitoring of ENGase catalyzed transglycosylation using chemical modified glycan

石井 希実、佐野 加苗、○松尾 一郎（群馬大院理工）
Nozomi Ishii, Kanae Sano, ○Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）の触媒部位に点変異を導入したグライコシンターゼは、その高い糖転移活性を利用することで均一糖鎖構造を有する糖タンパク質や化学修飾糖鎖が結合した抗体の合成など、様々な応用研究に利用されている[1]。ENGase の糖加水分解活性や糖転移活性を簡便に検出する系を確立することができれば、新規 ENGase の探索やグライコシンターゼ化した際の変異体スクリーニングが容易になり、糖タンパク質エンジニアリングに有用な研究ツールの開発が加速すると期待される。

我々は、ENGase の糖転移活性を高感度に検出することを目的として、蛍光標識糖鎖を糖供与体とした ENGase の糖転移反応を検討してきた[2]。昨年度の本大会では、蛍光標識した 4 糖オキサゾリン供与体と還元末端部分に FRET アクセプターとなる蛍光性置換基を導入したグルコサミン誘導体を用いた endo-M N175Q の糖転移反応を FRET による蛍光波長の変化により追跡した。その結果、HPLC による解析では糖転移生成物内の分子内 FRET が観測され、糖転移反応の追跡ができることを確認した。しかし、マイクロプレートリーダーによる酵素反応のリアルタイム検出は、用いた蛍光性置換基のバックグラウンド蛍光のために定量的な追跡ができないことを報告した。本研究では糖鎖に導入する蛍光性置換基の種類、および検出波長を検討した。その結果、蛍光性置換基の消光を追跡（FRET クエンチング）することで、マイクロプレートリーダーにより、ENGase の糖転移反応がリアルタイムで追跡できることが明らかとなったので、その詳細について報告する。



[1] P. M. Danby, S. G. Withers, “Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis”, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*, 1784-1794.
[2] N. Ishii, et al., “Specificity of Donor Structures for *endo*-β-*N*-Acetylglucosaminidase-Catalyzed Transglycosylation Reactions”, *ChemBioChem*, **2017** DOI: 10.1002/cbic.201700506.

ENGase, Transglycosylation, FRET

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2A20p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A20 会場

マイクロ波を利用した *N*-アセチルグルコサミン脱水反応の検討
Anhydrolysis of *N*-acetylglucosamine under microwave irradiation
○長島 生、奥山 市子、加我 晴生、清水 弘樹（産総研 生物プロセス）
○Izuru NAGASHIMA, Ichiko OKUYAMA, Harumi KAGA, Hiroki SHIMIZU (BPRI, AIST)

アミノ糖の代表格であるグルコサミンは、甲殻類に含まれるキチン、キトサンの主要構成成分であり、その用途として化学原料としてだけではなく、健康補助食品の添加物としても注目されている。一方、我々は、バイオマスの有効利用法研究の一環として、マイクロ波を用いた加水分解反応により単糖を得た際、同時に脱水反応が進行し、アンヒドロ糖が得られることを見出した。そして、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルグルコガラクトサミン、*N*-アセチルマンノサミンなどのアミノ糖に対しグリーンモチーフ I を用いて 2%テトラエチレングリコールジメチルエーテル含有スルホラン中マイクロ波加熱処理をおこなうと、6 員環型の 1,6-ピラノアミノ糖の他、新規化合物である 5 員環型の 1,6-フラノアミノ糖などが得られることを見出した。これらの知見を基に、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)のマイクロ波条件下脱水反応についてさらに検討した。

【方法】 *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)をジメチルスルホキシド(DMSO)中、MonoWave300 (Anton-Paar) や Wave Pro GPS-1000（東京理化器械）を用いてマイクロ波照射により 160℃、170℃、180℃に加熱したところ、主生成物として 5 員環の 1,6-アンヒドロ-*N*-アセチルフラノグルコサミド(AGFNAc)と 6 員環の 1,6-アンヒドロ-*N*-アセチルピラノグルコサミド(AGPNAc)を得た。これらの生成物の割合は HPLC により評価した。

【結果】 MonoWave300 を用いた場合、より高温で処理するほど脱水反応は短時間で反応がすすんだ。グリーンモチーフを用いてアミノ糖の脱水反応を進めたとき、生成するアンヒドロ糖体は、6 員環型の 1,6-ピラノシドより 5 員環型の 1,6-フラノシドが優先的に（高収率で）得られたが、今回の場合では、その傾向はみられなかった。Wave Pro GPS-1000 を用いて DMSO 中 160℃で GlcNAc を反応させたときは、MonoWave300 を利用したときと同様に反応は進行した。また、生成したアンヒドロ糖は 6 員環型の 1,6-ピラノシドが優先的に得られた。

【考察】 いくつかのマイクロ波反応装置を用いて GlcNAc の脱水反応を検討したところ、反応速度、つまり GlcNAc の消費速度については大きな差がなかった。しかし、AGPNAc と AGFNAc の生成速度に関しては、違った結果が得られた。市販のマイクロ波装置はメーカーにより電場と磁場の利用方法が異なること、また設定温度より一時的に高温になるといったオーバーシュートが起こることなど、装置間で異なった結果を与えることも多い。今回の AGPNAc と AGFNAc の生成速度の差異に関しては、使用溶媒に依存した可能性も考えられる。

microwave, glucosamine, dehydrolysis

発表責任者：清水　弘樹（hiroki.shimizu@aist.go.jp）

講演番号：2A20p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A20 会場

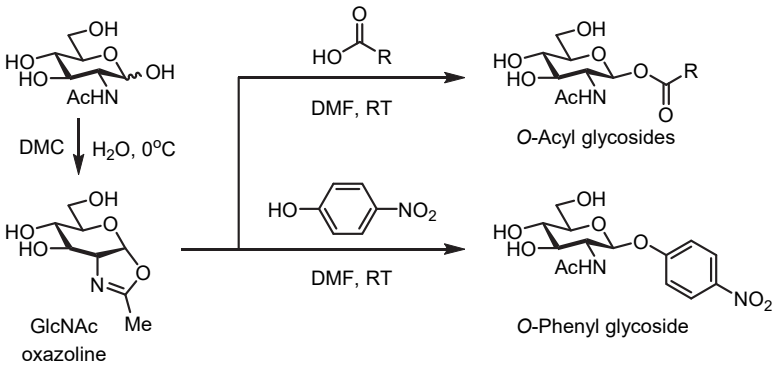
無保護糖供与体のオキサゾリン環開裂を伴う新規グリコシド化反応

A novel glycosidation reaction of unprotected sugar donors via oxazoline ring opening

○濱屋 湧[1]、安藤 弘宗[2]、石田 秀治[1,2]、田中 秀則[3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]高知大・総合研究セ）
○Yu HAMAYA[1], Hiromune ANDO[2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hidenori TANAKA[3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]Kochi Univ.)

【背景・目的】グリコシド化とは、糖供与体のアノマー位で求核種（アルコールなど）によってグリコシド結合を形成する反応であり、糖質合成の根幹をなす化学反応の一つである。糖は反応性の高い水酸基を複数有するため、化学的グリコシド化反応では、アノマー水酸基の代わりに脱離基を導入し、その他すべての水酸基を保護した糖供与体を用いることが一般的である。しかしながら、多段階を要する糖供与体合成の煩雑さやグリコシド化反応後の保護基の除去など化学的グリコシド化反応には未だ克服すべき課題が多い。一方、糖転移酵素を用いたグリコシド化反応は、量的供給やコスト面に問題を抱えるが、保護基を用いずに位置および立体選択的にグリコシド結合を形成できるため、非常に魅力的である。そこで本研究では、酵素法と同様に保護基を持たない糖供与体基質を用いてグリコシド結合形成を達成することを目的とする。本発表では、無保護 *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）オキサゾリン供与体の環開裂を伴う新規グリコシド化反応を報告する。

【結果】糖供与体である無保護 GlcNAc オキサゾリンは、遊離 GlcNAc に 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド（DMC）を作用させることで簡便に調製した。無保護 GlcNAc オキサゾリンに対し、DMF 溶媒中、室温でカルボン酸およびフェノールを活性化剤（プロトン供与剤）かつ糖受容体として反応させたところ、高収率かつ完全なβ選択性で*O*-アシルグリコシドおよび *O*-フェニルグリコシドを得ることに成功した。カルボン酸は様々な基質が適応可能で、脂肪族、芳香族に加えアミノ酸においても良好にグリコシド化が進行したが、フェノールは電子求引性置換基を有する基質のみグリコシド体を与えた。本グリコシド化反応は保護基を用いずにグリコシド結合を形成できるため、従来法より高収率かつ高い原子効率で目的とするグリコシド体を合成できる。本反応を利用することで、糖加水分解酵素の活性評価試験で用いられる *p*NP-GlcNAc の効率合成を達成した。現在、他の *N*-アセチル-2-アミノ糖についても検討しており、その結果も本年会で合わせて報告する。



protecting group-free glycosidation, unprotected sugar oxazoline donor, oxazoline ring opening

発表責任者：田中　秀則（htanaka@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2A20p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A20 会場

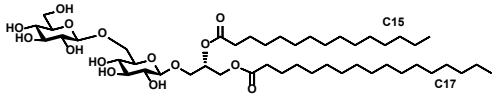
免疫賦活活性を有するグリセロ糖脂質の合成と生物活性

Synthesis and biological activity of glyceroglycolipids with immunostimulatory activity

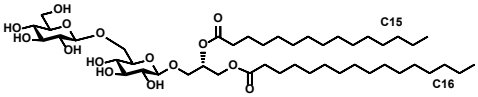
○栗田 一生[1]、八神 なほ子[1]、今井 崇史[3]、山崎 晶[3]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大院・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]大阪大・微生物病研究所)
○Motoki KURITA[1], Nahoko YAGAMI[1], Takashi IMAI[3], Sho YAMASAKI[3], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]Osaka Univ)

【目的】細菌感染症は全世界における死亡原因第一位であり、完全に有効な治療法は未だ確立されていない。その理由として、細菌の薬剤耐性能の獲得や抗菌薬の生体安全性への懸念が挙げられ、これらの課題を克服した新しい感染症治療法の開発が求められている。その中で我々は、新規治療法の開発を目指し、レクチン受容体群（Mincle）による免疫応答に着目した。病原性細菌が宿主に感染しようとする際、宿主の Mincle が細菌上のグリセロ糖脂質を認識することで免疫応答が起こる。この際、細菌は、宿主免疫系を回避するために、自己のグリセロ糖脂質、脂質を酵素により修飾することが知られている [1]。そのため、細菌によるグリセロ糖脂質の自己分解を阻害できれば、感染症の新しい治療法の開発に繋がる。しかし、細菌がもつグリセロ糖脂質の分解代謝系の理解は十分には進んでいない。従って、グリセロ糖脂質分解酵素の同定は、細菌感染機序の解明および新規治療法の開発を行う上で重要な鍵となる。そこで本研究では、Mincle 機能の抑制活性を有する黄色ブドウ球菌由来のグリセロ糖脂質である SPL-3 および脂肪酸の鎖長が異なる同族体を化学的に合成し、グリセロ糖脂質分解酵素の同定を目指すこととした。
【結果】SPL-3 およびその同族体の合成にあたり、鍵となるのは β グリコシド結合の形成方法である。

SPL-3



SPL-3 同族体



通常の糖鎖合成において β グリコシドを形成する際には、2 位アシル基による隣接基関与の利用が一般的である。しかし、分子内に脂肪酸エステルを有するグリセロ糖脂質の合成においては、アシル系保護基の利用は合成戦略上好ましくない。そこで本研究では、当研究室で開発した環状シリル系保護基を用いた立体選択的グリコシル化反応を応用することとした [2]。すなわち、2,3 位水酸基を TIPDS 基で保護したグルコース供与体を用いれば、分子内に 2 つ存在する β グリコシドを効率的に構築できると考えた。また、TIPDS 基は、エステル存在下でも化学選択的に脱保護することができるため、本合成に有効であると考えた。その結果、狙い通り、二箇所存在する β グリコシド結合をいずれも高い立体選択性にて構築することに成功した。また、その後の誘導化にも成功し、SPL-3 ならびに同族体の合成を達成した。本発表では、合成糖脂質を用いたアッセイ結果についても報告する。

[1] Ishikawa, E.*et al*., *J. Exp. Med*., **2009**, *206*, 2879.
[2] Yagami, N. *et al*., *Eur. J. Org. Chem*., **2017**, 4778.

Mincle, glyceroglycolipid, glycosylation

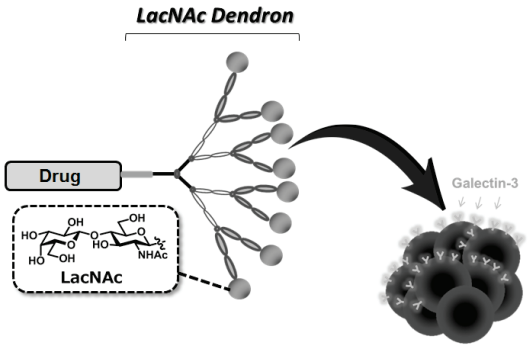
講演番号：2A20p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A20 会場

薬物送達システムへの応用を指向した新規糖鎖デンドロンの開発研究
Development of Novel Glycodendron for Drug Delivery System

○田中 友理[1]、前田 雄介[1]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2]、上野 義仁[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Yuri TANAKA[1], Yusuke MAEDA[1], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2], Yoshihito UENO[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【目的】医薬品開発において、副作用を抑制し、より効果的に薬物投与を行う方法として薬物送達システム（DDS）の研究は不可欠である。特にがんの化学療法において、抗がん剤の多くはがん細胞のみならず肝臓や腎臓、造血器官など正常組織にも殺傷能力を発揮する為、がん細胞のみに集中して作用するターゲッティング技術の開発が急務である。がん化に伴い特定のレクチンが細胞表層に発現することが知られており、糖鎖によるがん細胞へのアクティブターゲッティングが試みられている。しかし、糖鎖とタンパクのアフィニティ(K_D)は一般的に mM(10^3)程度と特異性を期待できるほど強くないという問題がある。生体内ではこの弱い親和性を補うため細胞表層の糖鎖は集積して存在し、細胞や外来物質との親和性を増強している。この現象は「糖鎖クラスター効果」と呼ばれ、近年、この効果を人工的に発現できる分子として多数の機能性糖鎖を側鎖に持つ“糖鎖デンドロン”が開発されてきた。糖鎖の集積化によるアフィニティの向上は最大 10^6 倍にも及ぶことから、我々はこの効果を薬物ターゲッティング技術に応用できると考えた。そこで本研究では、集積した糖鎖構造を有する糖鎖デンドロンと医薬をコンジュゲートする新規ターゲッティング技術の開発を目的とし、新規糖鎖デンドロンの合成を行った。

【方法・結果】本研究では大腸がん細胞を標的とし、大腸がん細胞表層の Galectin-3 が認識するβ-ガラクトシドを有する *N*-アセチルラクトサミン(LacNAc)を担持した新規糖鎖デンドロンを合成することとした。糖鎖デンドロンは、デンドロン骨格と LacNAc ユニットの 2 つのユニットに分けてそれぞれ合成した。デンドロン骨格は 1) 薬物とのクリックケミストリーによる安定的な結合形成を期待して末端をアジド基とし、2) 生体内での水溶性維持を狙いアミド結合で分岐させた構造とした。分岐構造は、二級アミン骨格を有する 2 つのユニットを Ns Chemistry を用いて合成後、組み立てることで構築した。LacNAc ユニットの合成では、アシル系保護基を用いた隣接基効果により目的とするβ-ガラクトシドを構築した。これまでに四糖および八糖の LacNAc を担持させた糖鎖デンドロンの合成に成功し、核酸医薬とのコンジュゲートを達成した。今後は、Galectin-3 との結合活性評価およびコンジュゲート体の遺伝子発現抑制能を評価する予定である。



cluster effect, drug delivery system, *N*-acetyllactosamine

発表責任者：安藤　弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A20p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A20 会場

ハイブリッド型コンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成
Synthesis of hybrid type chondroitin sulfate oligosaccharides
○上村 明寿美[1]、松下 健也[2]、中田 有美[3]、武田－奥田 尚子[4]、田村 純一[1,2,3,4] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大院工、[3]鳥取大地域環境、[4]鳥取大農)
○Asumi UEMURA[1], Kenya MATSUSHITA[2], Tomomi NAKATA[3], Naoko TAKEDA-OKUDA[4], Jun-ichi TAMURA[1,2,3,4] ([1]Dep. Agriculture Science, Grad. School Sustainability Science, Tottori Univ., [2]Grad. School Eng., Tottori Univ., [3]Dep. Regional Environ., Tottori Univ., [4]Fac. Agriculture., Tottori Univ.)

【目的】

グリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸(CS)は、D-グルクロン酸(GlcA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)からなる二糖ユニットで構成されている。この二糖ユニットの水酸基やアミノ基が位置特異的に硫酸化されることによって CS-O, -A, -D, -E などの型に分類され、CS はその硫酸化パターンの組合せによって様々な生理活性を発現する。近年、精密化学合成の手法によって得られる、構造が確かな CS オリゴ糖を用いて、CS の生理活性分析が行われている。これまで多くの生理活性分析では、単一の硫酸化パターンのみからなる合成 CS オリゴ糖を使用してきた。生体内に存在する CS は単一な硫酸化パターンで構成されているとは限らず、様々な硫酸化パターンが混在するヘテロタイプである。本研究では、CS 糖鎖の非還元末端側の DA 型構造に着目した。CS-DA 四糖と生理活性因子との結合を分析するため、還元側にビオチンリンカーを結合させた CS-DA ビオチン化四糖の精密化学合成を行うことにした。

【方法・結果】

予備実験から、CS-D オリゴ糖の GalNAc 6 位と GlcA 2 位水酸基を同時に硫酸化することが困難であることが明らかになっている。そのため、化学的にオルソゴナルな関係にある二種の保護基をそれぞれの位置に導入した $GalN_3$ 供与体と GlcA 受容体を合成した。これらを縮合し、β 選択的に CS-D 二糖ユニットを得た。得られた CS-D 二糖ユニットは、数工程を経て CS-D 二糖供与体へと誘導し、別途合成した CS-A 二糖受容体と縮合し、β 選択的に CS-DA 四糖保護体の合成に成功した。2+2 縮合の収率を向上させるため検討した保護基の組合せについても述べる。

Chondroitin sulfate, Synthesis, Oligosaccharide

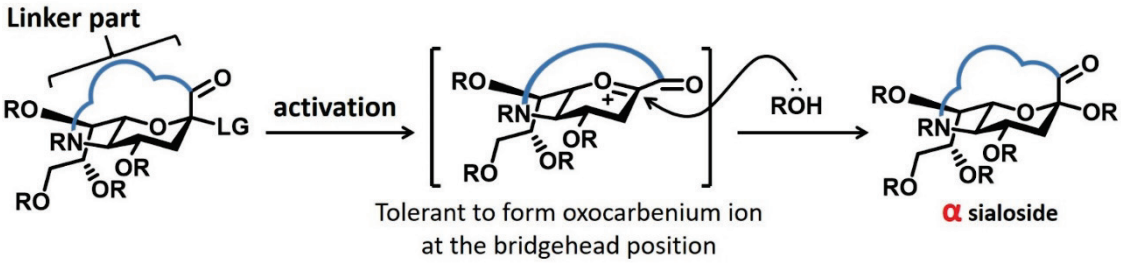
講演番号：2A20p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A20 会場

二環性供与体を用いたα-シアリル化の検討

Examinations of α-glycosidation of bicyclic sialyl donor

○河村 奈緒子[1]、加藤 慶一[2]、今村 彰宏[2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[1]([1]岐阜大・G-CHAIN、[2]岐阜大・応用生物)
○ Naoko KOMURA[1], Keiichi KATO[2], Akihiro IMAMURA[2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[1] ([1]G-CHAIN, [2]Gifu Univ.)

【目的】シアル酸を含有する糖鎖は細胞表面に存在しており、ウィルス感染、がん化、免疫応答などの生命現象に深く関与することが明らかにされてきた。これらシアロ糖鎖の化学合成において、α-シアロシド結合の構築が課題とされる。本研究では、オキソカルベニウムイオンに対する求核種の攻撃面を立体的に方向づけ得るシアル酸供与体を設計し、シアリル化反応の完全な立体制御を試みた。すなわち縮環の橋頭位にオキソカルベニウムイオンが発生するような大環状二環性シアル酸供与体を用いることで、求核種の攻撃面を排他的に制御可能となることを着想し、この原理の検証を行った。
【方法及び結果】シアル酸のα-SPh 誘導体の C5 位のアミノ基に架橋ユニットを導入した後、C1 位との分子内環化反応に供することで大環状二環性供与体を収率良く合成した。この二環性供与体をジクロロメタン溶媒中、NIS/TfOH を活性化剤としてグリコシド化反応に供したところ、α-シアロシドと 2,3-ene 体のみが得られた。続いて、架橋ユニットの鎖長や置換基がこれらの生成比及び反応速度に大きく影響することを見出し、架橋部のデザインの最適化を行った。本発表では、この二環性シアル酸供与体と各種糖受容体のグリコシド化反応の結果について報告する。



sialylation, stereoselective glycosylation, sialic acid

講演番号：2A20p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A20 会場

グロボ系ガングリオシドの膜ドメイン形成機構解明を目指した蛍光アナログ分子の開発

Development of fluorescent analogs of globo-series gangliosides for elucidating the mechanisms of nanodomain formation in the cell membrane

○浅野 早知[1]、河村 奈緒子[2]、今村 彰宏[1]、鈴木 健一[2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○ Sachi ASANO[1], Naoko KOMURA[2], Akihiro IMAMURA[1], Kenichi SUZUKI[2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【背景・目的】「グロボ系列」に属するガングリオシドである SSEA (発生段階特異的胚抗原) -3/-4 及び Globo-H は、ヒト未分化細胞や種々の癌細胞表面に発現し、正常細胞には発現しないという特異性を持つ。更に、膜ドメイン形成に関与することが分かっており、分化・癌化との関連性について大変興味深い。このような特異性や分化・癌化との関連性の解明には、分子レベルでの挙動解明が糸口となると考えられる。その手段として、膜分子の挙動を単分子ごとに、直接捉える「一分子イメージング」が有効である。我々はこれまでに、ガングリオ系ガングリオシド (eg. GM_3) の蛍光アナログを有機化学的手法により合成し、GPI アンカー型タンパク質 (eg. CD59) クラスターとの相互作用[1]や、ガングリオシド同士のホモフィリックな相互作用の観察に成功している。本研究では、一分子イメージングによる膜ドメイン形成機構及び細胞の分化・癌化のメカニズム解明、延いては関連疾患の発症機構の解明やその治療法の開発を目指し、グロボ系ガングリオシドの蛍光アナログの合成を行った。
【方法・結果】2017 年度大会[2]では、SSEA-3 及び Globo-H 蛍光アナログの合成と、合成の過程で設計した GalNTroc 供与体[3]の 4,6 位に *p-tert*-ブチルベンジリデン基 (TBBzld) を導入することにより、種々の有機溶媒に対する溶解性が向上し、スケールアップ合成を可能にしたことを報告した。今年度は、SSEA-4 蛍光アナログの合成を行った。鍵反応となるのは、非還元末端のシアル酸 (Neu) の導入である。我々は近年、Neu の β 面側を大環状ラクトンで架橋した「二環性 Neu 供与体」を設計し、完全な立体選択性で α-シアロシドを形成させる手法を開発したので、本研究でもこれを適用した。蛍光分子は Neu 9 位にアミド結合を介して導入するため、9 位を TFA アミド基へと変換し、最終脱保護の際に NH_2 基へ誘導できるよう設計した。合成した Neu 供与体を SSEA-3 四糖骨格のシアリル化反応に供したところ、良好な収率で Neu を導入することに成功した。その後、種々の変換を経て五糖供与体を合成し、Glc-Cer の導入、脱保護、蛍光分子の導入を行い、SSEA-4 蛍光アナログの合成を達成した。本研究により、二環性 Neu 供与体が Neu を含むガングリオシドの蛍光アナログの合成へ応用可能であることが示唆された。

[1] N. Komura. *et al*. *Nat*. *Chem*. *Biol*. **2016**, *12*, 402-410.
[2]日本農芸化学会 2017 年度大会 2C12a08.
[3] A. Imamura. *et al*. *J*. *Org*. *Chem*. **2009**, *74*, 3009-3023.

single molecule imaging, ganglioside, sialic acid

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A20p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A20 会場

野生ニホンジカ未利用部位に含まれるコンドロイチン硫酸の分析
Analytical study of chondroitin sulfate in the unused part of wild *Cervus nippon*
○田村 純一、武田一奥田 尚子（鳥取大農）
○Jun-ichi TAMURA, Naoko TEKEDA-OKUDA (Faculty of Agriculture, Tottori Univ.)

［目的］
近年、全国的に野生のニホンジカが急増し、山林や農耕地における農作物への食害などが問題となっている。そのため、野生のシカの駆除が推進され、捕獲頭数が増加しているが、駆除獣の処理が新たな課題となり、皮や肉を積極的に利用するなどの対策が講じられている。しかし、ツノや内臓、骨などは十分に利用されておらず、これらの未利用部位の有効活用が課題となっている。これまでの研究で、我々の研究グループは、ニホンジカの早い成長段階のツノである鹿茸を調査した。その結果、鹿茸の先端部脱脂乾燥物 100 g 中に 1 g 以上のコンドロイチン硫酸（CS）が含まれていることを明らかにし、CS 資源として有望であることを示した。また、骨化が進行している根元と、軟骨組織で構成されている先端部では CS の硫酸化パターンが異なることも明らかにした。一方、気管や肩甲軟骨は軟骨組織によって構成された部位であり、CS が多量に含まれている可能性が高い。そこで本研究では、気管や肩甲軟骨に着目し、CS の単離と構造解析を行った。加えて、胃や腸などの消化管についても同様の分析を行った。

［方法・結果］
野生ニホンジカの器官（組織）を細断し、エタノールで脱脂後、減圧乾燥して脱脂乾燥物を得た。得られた脱脂乾燥物をプロテアーゼで処理し、透析後、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させた。得られた糖鎖はコンドロイチナーゼ ABC で二糖単位にまで分解し、HPLC（アミノカラム、YMC-Pack PA-G）を用いて CS の含有量と硫酸化パターンを測定した。その結果、使用した器官や部位によって CS の含有量と硫酸化パターンが異なることが判明した。

Chondroitin sulfate, *Cervus nippon*, Compositional analysis

発表責任者：田村純一（jtamura@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A20p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A20 会場

モサオゴノリからκ-カラギーナン様アガロースの同定

Identification of κ-carrageenan like agarose from *Gracilaria coronopifolia*

○田幸 正邦[1,2]、蒋 文[1]、島袋 隼平[1]、小西 照子[1]（[1]琉球大農生資科、[2]健康長寿科研）
○Masakuni TAKO[1,2], Jiang WEN[1], Jyunpei SHIMABUKURO[1], Teruko KONISHI[1]（[1]Univ. Ryukyus, [2]Health Longevity Res. Lab.）

演者の 1 人田幸は、先に、アガロースのゲル化機構およびその原理を解明した[1,2]。また、沖縄県に自生する紅藻類から寒天およびメチル基を置換する寒天（アガロース）を同定した[3,4]。ここでは、紅藻の 1 種であるモサオゴノリからκ-カラギーナン様アガロースを同定した結果について報告する。

方法：モサオゴノリは沖縄県石垣島で採取して供試した。水道水で洗浄後、痛風乾燥機（40℃）で 48 時間乾燥して粉砕し使用した。アガロースの調製は常法によった。メタノリシスは 0.5M 無水メタノール塩酸で 100℃、12 時間行った。^{1}H-および ^{13}C-NMR の測定は 400MHz の核磁気共鳴装置（Bruker, ドイツ）を使用して行った。

結果：乾燥藻体から 15.4%の収率で多糖を得た。硫酸基の含量は 20.3%であった。多糖のメタノリシスを行い、薄層クロマトグラフィーにより 3,6-アンヒドロ-メチル-α-ガラクトシド、3,6-アンヒドロ-メチル-β-ガラクトシドおよびメチル-β-D-ガラクトシドを同定した。赤外吸収スペクトルの結果から D-ガラクトースの C-4 に硫酸基が置換する多糖であることが判った。^{1}H-および ^{13}C-NMR のシグナルはκ-カラギーナンのそれらと類似した。0.2%多糖水溶液に KCl（0.2%）を添加すると透明で軟弱なゲルを形成したが、10 分後に壊れた。多糖水溶液（0.2%）の比旋光度は-1.0° であった。以上の結果から、本多糖は硫酸基を置換するアガロースと結論した。

文献

1. M. Tako and S. Nakamura, *Carbohydr. Res.*, **180**, 277-284 (1988).
2. M. Tako, *J. Appl. Glycosci.*, **47**, 49-53 (2000); *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **6**, 22-36 (2015).
3. 田幸正邦, 応用糖質科学, 41, 305-310 (1994).
4. M. Tako, M. Higa, K. Medoruma and Y. Nakasone. *Botanica Marina*, **42**, 513-517 (1999).

Gracilaria coronopifolia, kappa-carrageenan like agarose, NMR analysis

発表責任者：田幸正邦（tako@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2A20p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A20 会場

動物由来シアル酸 9-リン酸合成酵素(SPS)の性質の解析

Analysis of the properties of sialic acid 9-phosphate synthase (SPS) derived from animals

○石川 寛菜[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2]、北島 健[1,2] ([1]名大・生物機能センター、[2]名大院・生命農学研究科)
○Hirona ISHIKAWA[1,2], Chihiro SATO[1,2], Ken KITAJIMA[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

シアル酸は複合糖質の糖鎖の非還元末端残基として存在する酸性 9 炭糖であり、N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (KDN) の 3 大分子種からなる。Neu5Ac と KDN は同一酵素群によって生合成され、Neu5Gc は CMP-シアル酸レベルで Neu5Ac から転換される。シアル酸生合成経路において、シアル酸単糖合成の主反応はシアル酸 9-リン酸合成酵素 (SPS)が担っている。SPS は 6 炭糖 6-リン酸と 3 炭糖のホスホエノールピルビン酸 (PEP)から 9 炭糖のシアル酸を作る鍵酵素である。ヒト SPS は次の二つの反応を触媒する。

反応 1：ManNAc-6-P + PEP → Neu5Ac-9-P + Pi

反応 2： Man-6-P + PEP → KDN-9-P + Pi

しかし大腸菌を用いて発現させた組換え体マウス SPS は、in vitro において反応 1 を触媒するが、反応 2 は触媒しない (Nakata et al., 2000)。またラット肝臓より精製された SPS も同様に in vitro において KDN-9-P 合成活性がないことが報告されている (Lawrence et al., 2000)。しかし、RNAi 法によって SPS を発現抑制したマウス由来細胞では Man 添加培養時の細胞内遊離 KDN 量が著しく減少することなどから、マウス細胞内において SPS が KDN の生合成を担っていることも示されている (Go et al. unpublished)。これに対し、昆虫においては Drosophila melanogaster (ハエ), Spodoptera frugiperda (ガ), Tribolium castaneum (コクヌストモドキ)から SPS がクローニングされ、ハエ SPS が Neu5Ac-9-P, KDN-9-P 合成活性を有することが示された。一方、ガ SPS、コクヌストモドキ SPS は活性を示さなかった (Hamaguchi et al. unpublidhed)。このように哺乳類においても昆虫においても SPS 活性には種差が見出され、生物種の違いとシアル酸の存在や意義の関係が注目される。

そこで今回､生物種間での SPS の構造と機能の解明を行うことを目的として､脊椎動物 SPS として、ヒト、マウス、メダカ、昆虫 SPS として、ハエ、ガ、コクヌストモドキについて大腸菌発現組換え体酵素を用いた多量体化解析および速度論的解析を行って定量的に比較検討した。

E-mail: ishikawa.hirona@b.mbox.nagoya-u.ac.jp

Sialic acid 9-phosphate synthase (SPS), Kinetic analysis, Multimerization analysis

講演番号：2A20p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A20 会場

Establishment and characterization of medaka fish deficient in alveolin, a cortical alveolus-specific astacin family protease

○Bo FU[1,2], Chihiro SATO[1,2], Ken KITAJIMA[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

Cortical alveoli (CA) are secretory vesicles that are aligned beneath the vitelline envelope (VE) of unfertilized eggs of teleost fishes. At fertilization CA fuse with the plasma membrane to secrete their contents into perivitelline space (PVS). This morphological change is called cortical reaction, during which formation of the fertilization envelope (FE) and the PVS takes place through the elevation and hardening of VE. Two CA components, hyosophorin and alveolin, have been well characterized. Hyosophorin is a major sialic acid-rich glycoprotein. During the exocytosis of CA, the high-molecular-weight form of hyosophorin (H-hyosophorin), consisting of tandem-repetitive structure of glycononapeptide in medaka, undergoes depolymerization to the least repeating unit (L-hyosophorin). Alveolin is a protease that was first found in medaka oocytes, and considered to cleave the sialylated VE component ZPB, to complete the VE hardening process. Several lines of evidence led us to hypothesize that alveolin is involved not only in processing of the ZPB, but also in depolymerization of hyosophorin. In this study, to demonstrate our hypothesis, we prepared the alveolin-knockout (KO) medaka by CRISPR/Cas 9 system. The established alveolin-KO medaka fish were found to be fertile; however, they had unusual phenotypes, such as abnormal VE, extremely large volume of PVS, and delay in developmental process of early embryos. Thus, the significance of alveolin in early development of medaka is suggested.

Fertilization, Astacin family metalloprotease, Cortical granule

発表責任者：FU Bo（fu.bo@j.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A20p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A20 会場

α2,8-シアル酸転移酵素(ST8SIA)の生合成するエピトープと抗シアル酸抗体の特異性の解析

Analysis of biosynthesis epitope of α2,8-sialyltransferase (ST8SIA) and specificity of anti-sialic acid antibody

○津田 佳奈[1,2]、高橋 映莉乃[1,2]、北島 健[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2] ([1]名大・生物機能センター、[2]名大・生命農学)
○KANA TSUDA[1,2], ERINO TAKAHASHI[1,2], KEN KITAJIMA[1,2], CHIHIRO SATO[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, [2]Nagoya Univ.)

シアル酸は通常糖鎖の非還元末端に 1 残基存在しているが、まれにその末端シアル酸残基の上にさらにシアル酸の直鎖ポリマーが結合するオリゴ・ポリシアル酸構造として存在する場合がある。重合度 8 以上のポリシアル酸(polySia)は、その責任酵素や機能の解析が進んでおり、記憶、社会性行動、精神疾患に関与する。モノシアル酸とポリシアル酸の中間的な鎖長(重合度 2-7)をもつオリゴシアル酸構造に関しては、特にジシアル酸に関してはガングリオシドでその解析が進んでいるが、糖タンパク質に関しては担体タンパク質、責任酵素及び機能などほとんど未解明である。一方、哺乳類では、シアル酸をα2,8 結合で複合糖質上に転移する酵素は ST8SIA1~6 までの 6 種類が知られており、ST8SIA1 と 5 が糖脂質上のジシアル酸を、ST8SIA2 と 4 が NCAM 上のポリシアル酸を生合成することが明らかになっている。また、α2,8-シアル酸構造に対する抗体の特異性に関しては、当研究室でのエピトープ解析が進んでいる(1)。しかし、α2,8 シアル酸転移酵素(ST8SIA)が細胞表面につくり出すシアルエピトープと抗α2,8 結合シアル酸認識抗体の反応性に関しては解析がほとんど行われていない。そこで本研究では ST8SIA が細胞膜表面上に生合成するシアル酸エピトープの構造を明らかにすることを目的とした。pcDNA3.1 にマウス ST8SIA1 から 6 までの遺伝子を組み込みんだプラスミドを作製し、それぞれのプラスミドをマウス神経芽細胞腫に遺伝子導入を行った。G418 選択をかけ、それぞれの安定発現株を樹立した。また、ST8SIA3 の shRNA を導入し、ST8SIA3 の遺伝子抑制株を樹立した。それらの細胞を用いてシアル酸重合度特異的抗体によるフローサイトメトリー解析、ウェスタンブロッティング、TLC 免疫染色を行った。今回用いた抗体は重合度 2 のジシアル酸、重合度 3 のトリシアル酸、重合度 5 以上のオリゴ・ポリシアル酸、重合度 11 以上のポリシアル酸を認識する抗体である。その結果、ST8SIA1 過剰発現細胞ではジ・トリシアル酸構造特異的抗体が、ST8SIA2, 4 過剰発現細胞ではポリシアル酸を認識する抗体が反応した。内在的に発現している ST8SIA3、ST8SIA6 は過剰発現を行ってもいずれの抗体を用いても大きな反応性の変化は示さなかった。しかし、ST8SIA3 の抑制細胞株ではトリシアル酸エピトープの減少とα2,3-シアル酸エピトープの増加が観察された。この結果から、ST8SIA3 が糖タンパク質上のα2,3-のシアル酸上にトリシアル酸を合成していることが考えられた。一方、ST8SIA5 についてはトリシアル酸の減少がみられた。ST8SIA5 の作るジシアル酸構造は他の ST8SIA の生合成する構造と異なり、トリシアル酸を伸長させにくいような構造であることが考えられる。以上の結果より、各 ST8SIA 転移酵素と細胞表面におけるシアル酸エピトープの生合成経路に関しては更なる解析が必要であることがわかった。

(1) Sato C., Kitajima K. (2013) J Biochem (Tokyo). 154(2), 115-136.

sialyltransferase, ganglioside, antibody

講演番号：2A21a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A21 会場

β-glucosidase をタグとして用いたタンパク質の結晶化手法の開発

Development of protein crystallization method using ß-glucosidase as a tag

○久家 滉太[1]、佐々木 大嗣[1]、須恵 雅之[2]、佐々木 康幸[1]、伊藤 晋作[1]、矢嶋 俊介[1]([1]東農大　バイオ、[2]東農大　生物応用化学科)
○Kota KUGA[1], Daishi SASAKI[1], Masayuki SUE[2], Yasuyuki SASAKI[1], Shinsaku ITO[1], Shunsuke YAZIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric, Department of Bioscience, [2]Tokyo Univ. of Agric,Department of Chemical)

<背景・目的>

β-glucosidase は糖の β-グリコシド結合を加水分解する酵素であり、幅広く生物に分布している。我々のグループではコムギ（*Triticum aestivum*）由来の β-glucosidase の立体構造を以前に解明した。この β—glucosidase は溶液中・結晶中で 6 量体を形成しており、結晶中の溶媒含有量が 77%と一般的なタンパク質と比べて高い。このことは結晶中に隙間が多いことを意味している。そこで、β-glucosidase をタグとし、解析したいタンパク質を融合発現させ、結晶化させることで、解析したいタンパク質の構造を元の隙間の領域に得ることが出来ないかと考えた。そこでそれを検証するために、ubiquitin との融合タンパク質を用いて結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。

<方法>

T. aestivum 由来の β-glucosidase(521 残基)のうち、以前の解析で構造が確認出来なかった C 末端部分を除いた 502 残基までの遺伝子及び proline を 1～6 個導入したリンカーの下流に *Homo sapiens* 由来の ubiquitin 遺伝子を pET28b(＋)に組み込み、これを Rosetta2(DE3)に形質転換させた株を用いた。これらの株を 37℃で培養した後、IPTG により発現を誘導し、その後 16℃で一晩培養した。回収した菌体を破砕し、可溶性画分を Ni-アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製したタンパク質を濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。得られた結晶の X 線照射実験は高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory にて行った。

<結果>

リンカーの長さによらず、作成したコンストラクトすべてで目的タンパク質の発現が見られ、それらは、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果より、6 量体を形成していた。また、スクリーニングの結果、結晶もほぼすべてのコンストラクトで得られたが、結晶の形が異なるものがあった。現在これらの構造解析を行っている。

Fusion protein, X-ray, conformation

講演番号：2A21a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A21 会場

Bacillus sp. OxdB-1 由来アルドキシム脱水酵素の構造解析に向けた結晶スクリーニング
Crystal screening of aldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. OxdB-1 for structural analysis
○森 智也[1]、松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工、[2]JST ERATO)
○Tomoya MORI[1], Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST ERATO)

【目的】アルドキシム脱水酵素（Oxd）はアルドキシム化合物の脱水反応を触媒する酵素であり、生成されるニトリル化合物は工業的に広く利用されている。当研究室は「アルドキシム - ニトリル経路」を提唱し、様々な Oxd の酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、*Rhodococcus erythropolis* 由来 Oxd (OxdRE) の立体構造を明らかにした[1]。OxdRE と 41%の配列相同性を示す *Bacillus* sp. OxdB-1 由来 Oxd (OxdB) の立体構造が未解明であることから、これまでに結晶スクリーニングを行ったが良質な結晶を得ることができなかった。そこで OxdB の結晶の取得を目的として、①野生型酵素への Lys 残基のメチル化修飾と②変異型酵素を用いた結晶スクリーニングを行った。
【方法】①野生型酵素へのメチル化修飾：OxdB 遺伝子を pET22b (+) ベクターに挿入し、得られた発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。培養後、菌体を超音波破砕し、遠心分離で得られた上清をニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製した。5 mg の精製酵素をホルムアルデヒド及びジメチルアミンボラン複合体を用いて Lys 残基のメチル化修飾を行った。②アミノ酸変異導入：OxdB の一次配列を用いて SWISS-MODEL で立体構造を予測し、そのタンパク質表面に位置する Lys50、Glu85、Lys104、Glu215 に対し、QuikChange (Stratagene) で Ala に各々置換した。得られた変異型酵素遺伝子を上記と同様に、発現・培養し、精製酵素を取得した。結晶スクリーニング：Crystal Screen 1,2、Index (Hampton Research)、 PACT Suite (Qiagen) を用いて、20°C の条件でスクリーニングした。
【結果】①野生型酵素へのメチル化修飾：タンパク質表面の Lys 残基の疎水性度の向上が結晶形成を促進する報告例[2]から、Lys 残基をメチル化した OxdB で結晶スクリーニングを行い、rod cluster 様の結晶を観察した。②アミノ酸変異導入：表面の Lys や Glu 残基がタンパク質の結晶の形成に影響する報告例[3]から、K49A/K50A、E83A/E85A、K103A/K104A、E213A/E215A に各々変異導入したところ、いずれの変異体も封入体を形成した。そこで、いずれも活性を有する一点変異体（K50A、E85A、K104A、E215A）を作成し、変異型酵素 K104A において plates 様の結晶が取得できた。以上の結果から、OxdB において Lys 残基のメチル化もしくは変異導入による疎水性度の向上により、結晶の形成が促進されることが明らかになった。
【参考文献】[1]H. Sawai *et al*, *J. Biol. Chem*., **284**, 32089-32096 (2009)., [2]N. Pakharukova *et al*, *Acta Crystallogr F*, **73**, 450-454 (2017)., [3]K. Longenecker *et al*, *Acta Crystallogr. D*, **57**, 679-688 (2001).

aldoxime dehydratase, crystal screening, mutagenesis

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A21a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A21 会場

ドリアン由来アルコールアシルトランスフェラーゼの結晶構造解析

Crystal structure of alcohol acyltransferase from *Durio zibethinus*

○元島 史尋[1,2]、大島 遼太郎[1]、石田 裕幸[2,3]、森 利明[1]、吉川 千晶[1]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大・生工研セ、[2]ERATO, JST、[3]八丈島発光生物研究所）
○Fumihiro Motojima[1,2], Ryoutarou Ohshima[1], Ishida Yuko[2,3], Toshiaki Mori[1], Chiaki Yoshikawa[1], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Res. Inst. of Luminous Organisms)

【目的】低分子のカルボン酸エステルは植物の果実の主要な芳香成分である。カルボン酸エステルの生合成の最終段階を触媒しているのが Alcohol acyltrancferase (AAT)であり、アシル CoA のアシル基をアルコールへ転移する。当研究室において様々な植物について AAT のスクリーニングを行ったところ、*Durio zibethinus*（ドリアン）由来 AAT (DzibAAT)の精製に成功し、他の AAT に比べて高い比活性を持つこと明らかとなった。DzibAAT は様々な代謝物のアシル化を行う Benzyl alcohol acetyltransferase (BAHD) family に属する酵素である。しかし、アルコールを基質とする AAT についてはこれまで構造が解明されていなかった。そこで DzibAAT の反応機構および基質特異性を理解するため、結晶構造解析を行った。

【結晶構造解析】DzibAAT のクローニングはドリアンの果実から合成した cDNA を基に AAT 保存配列に対するプライマーを用いた RACE 法によって行った。DzibAAT は CoA 存在下で結晶化した。結晶構造解析はアミノ酸一致度約 30%の類縁構造を用いて分子置換法で行い、分解能 2.5Å で決定した。

他の BAHD family では CoA と基質が活性部位のトンネルの両端から結合する。一方、DzibAAT では活性部位のトンネルの一端が閉じており、アルコールはアシル CoA と同じ空洞に結合すると予想された。AAT の反応機構は他の BAHD family と同様に、活性中心に存在するヒスチジン残基がアルコールの水酸基のプロトンを引き抜き、酸素原子がアシル CoA のカルボニル炭素を求核攻撃してエステルが合成される、と考えられた[1]。

【Reference】[1] Suzuki H, *et al., Biochemistry*, **42**, 1764–1771 (2003)

Alcohol acyltransferase, Crystal structure, Directed evolution

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A21a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A21 会場

The crystal structure and catalytic mechanism of recombinant hydroxynitrile lyase from cyanogenic millipede, Oxidus gracilis

○Siriporn CHAIKAEW[1,2], Fumihiro MOTOJIMA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

[Purpose**]** Hydroxynitrile lyases (HNLs) catalyze the cleavage of cyanohydrins into corresponding carbonyl compounds and hydrogen cyanide, and the synthesis of cyanohydrins in the reverse reaction. Recently, HNLs were discovered from cyanogenic millipedes, which were reported to be a huge source of HNL (Dadashipour *et al*., 2015; Yamaguchi *et al*., submitted). HNL from short-flange millipede, *Oxidus gracillis* (*Ogra*HNL) exhibits high specific activity and enantioselectivity toward (*R*)-mandelonitrile synthesis. However, the characterization of *Ogra*HNL and its reaction mechanism have not been investigated. The aim of this study is to elucidate the catalytic mechanism of *Ogra*HNL based on its crystal structures.

[Materials and Methods**]** *Ogra*HNL expressed in *Escherichia coli* SHuffle T7 was purified to homogeneity before characterization and crystallization. Screening for optimal crystallization conditions was performed at 20°C using the sitting drop vapor diffusion method. The single crystal was soaked quickly in a reservoir containing 25% glycerol and directly flash-cooled under a liquid nitrogen stream. For enzyme-substrate complex preparation, the crystal was soaked in a drop of substrates before flash-cooled. The diffraction data was collected in-house using a Rigaku Micro-Max007 CuKα rotating-anode X-ray generator and a Rigaku R-AXISVII image-plate detector. Model building and structure refinement were performed using Coot and Refmac, respectively. All structural figures were prepared by PyMol.

[Results**]** The crystal structures of *Ogra*HNL in complex with benzaldehyde and (*R*)-mandelonitrile were solved at 2.5 Å resolution. Analysis of the complex structure suggests the reaction mechanism that relies on general acid/base catalysis by Arg42 and Lys121. In the cleavage reaction, a proton of hydroxyl group of (*R*)-mandelonitrile is abstracted by Lys121. An electron is transferred from lysine to the nitrile leaving group and then the cyanide ion abstracts a proton from Arg42 resulting in the releases of benzaldehyde and HCN. In the synthesis reaction, a sequence of reactions occurs in the opposite direction of cyanohydrin cleavage.

[Reference] M. Dadashipour et al, *PNAS*, **112(34),** 10605-10610 (2015).

T. Yamaguchi et al, *Sci. Rep.*, submitted.

Hydroxynitrile lyase, Crystal structure, Oxidus gracilis

発表責任者：ASANO Yasuhisa（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A21a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A21 会場

Expression, purification and crystallization of FsrC, the cell surface receptor of the cyclic peptide quormone GBAP

○ Mimin ZHANG[1], Kou HAYAKAWA[1], Yi LU[1], Yukei KATAYAMA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Michio SUZUKI[1], Kenji SONOMOTO[3], Jiro NAKAYAMA[3], Masaru TANOKURA[1], Koji NAGATA[1]
([1]The univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]Kyushu Univ.)

【Background and Objectives】

Enterococcus faecalis is a kind of commensal bacterium that inhabits the gastrointestinal tracts of humans and other mammals, and can cause life-threatening infections in humans, especially in the nosocomial (hospital) environment. However, vancomycin/daptomycin resistant *E. faecalis* have been recognized as dreadful nosocomial pathogens whose treatment is a big challenge. FsrC is the component of the FsrC-FsrA two-component signal transduction system involved in quorum sensing (QS) in *E. faecalis*. In the *fsr* system, a cyclic peptide called gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) auto-induces the expression of the *gelE-sprE* which was identified as the virulence factor via the FsrC-FsrA two-component system. FsrC is the membrane-bound receptor of GBAP with an intracellular histidine kinase domain and FsrA is the cognate response regulator. The GBAP-mediated QS is considered as a target for the development of antibacterial drugs, since inhibiting this QS signaling is expected to suppress the expression of the two pathogenicity-related proteases without killing the bacteria. The objective of this research is to obtain the high-resolution crystal structure of the GBAP-FsrC complex to understand how GBAP binds FsrC and activates the histidine kinase activity of FsrC and to contribute to the molecular design of efficient *fsr* QS inhibitors.

【Methods and Results】

The gene of FsrC was cloned into pBAD/His. Full-length FsrC protein was successfully expressed in *Escherichia coli*. The protein was purified with HisTrap HP column and was further purified with Superdex 200 gel filtration column. Co-crystallization of FsrC with GBAP was performed. Crystals were obtained but the crystal structure could not be solved because of the low resolution of the diffraction data. To obtain high-resolution diffraction data of FsrC-GBAP crystals, the improvement of expression level of FsrC, the suppression of aggregation of FsrC, and the search for suitable detergent(s) for the extraction and purification of FsrC are in progress.

membrane-bound receptor, crystallization, FsrC

講演番号：2A21a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A21 会場

Microbacterium hydrocarbonoxydans 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析

Crystal structure of ABC transporter substrate binding subunit from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*

○島村 香穂[1]、秋山 友了[1]、竹野谷 美穂子[1]、伊藤 晋作[1]、佐々木 康幸[1]、高谷 直樹[2]、矢嶋 俊介[1] ([1]東農大・生命科・バイオ、[2]筑波大・生命環境)

○Kaho SHIMAMURA[1], Tomonori AKIYAMA[1], Mihoko TAKENOYA[1], Shinsaku ITO[1], Yasuyuki SASAKI[1], Naoki TAKAYA[2], Shunsuke YAJIMA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Tsukuba Univ.)

【背景･目的】

ヒドラジドは、ヒドラジンとカルボン酸を用いることで容易に合成できる化合物である。しかし、天然にはほとんど存在しないため、多くの生物はヒドラジドを代謝する機構を持たないと考えられている。ゆえに生体内での代謝、生合成機構等は未解明な部分が多い。近年、ヒドラジドを代謝可能な *Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離された。さらに同株からヒドラジド化合物の分解活性を有する hydrazidase が単離、同定された。Hydrazidase 遺伝子の前後には、センサー型転写因子と 4 つの構成因子からなる ABC トランスポーターがコードされていた。構成因子の 1 つである基質結合サブユニット(Substrate Binding Subunit : SBS)は ABC トランスポーターの基質特異性を決めるという重要な役割を担っている。今回は、ヒドラジドの輸送機構解明を目指して SBS の立体構造解析を行った。

【方法】

M. hydrocarbonoxydans 由来 SBS（全長 515 アミノ酸）の N 末端のアミノ酸のうち、シグナル配列を除き、N 末端に His-tag をつけた遺伝子を pET28b(+)に組み込み、これを Rosetta2(DE3)及び B834 に形質転換させた株を用いた。この株を 37 °C で培養した後、IPTG によりタンパク質の発現誘導を行い、その後 16 °C で一晩培養した。回収した菌体を破砕し、可溶性画分を Ni カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製したタンパク質を濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。約 5 日ほどで、0.8 mm 長の棒状結晶が得られた。X 線照射実験は SPring-8 の BL38B1 にて行った。

【結果】

野生型の結晶を用いて構造解析を行ったが、分子置換法により構造を決定することが出来なかった。そのため、メチオニン要求株 B834 を用いたセレノメチオニン（Se-Met）化タンパク質の精製・結晶化を行った。Se-Met タンパク質の結晶を用いて SAD 法により位相決定を行い、分解能 1.75 Åの回折データを用いて構造決定に至った。得られた構造は 3 つのドメインから構成されており、リガンドを結合するための広いキャビティが観察できた。これは、配列の相同性からも予測された構造既知のジペプチドトランスポーターの SBS と類似していた。

ABCtransporter, structure, hydrazide

講演番号：2A21a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A21 会場

超好熱アーキア由来 FAD 依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析
Structure of Dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon
○大志田 達也[1]、冨家 英嗣[1]、川上 竜巳[2]、里村 武範[3]、米田 一成[4]、大島 敏久[5]、櫻庭 春彦[1]（[1]香川大農、[2]徳島大生物資源、[3]福井大工、[4]東海大農、[5]大工大工）
○Tatsuya OHSHIDA[1], Eiji TOMIIE[1], Ryushi KAWAKAMI[2], Takenori SATOMURA[3], Kazunari YONEDA[4], Toshihisa OSHIMA[5], Haruhiko SAKURABA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Tokushima Univ., [3]Fukui Univ., [4]Tokai Univ., [5]Osaka Inst. of Tech.)

色素依存性脱水素酵素（Dye-DH）は、ジクロロインドフェノール（DCIP）やフェリシアン化カリウムなどの人工の酸化還元色素を電子受容体として、アミノ酸、有機酸、糖などの酸化反応を触媒する。一般に Dye-DH は、FAD または FMN を補酵素として利用するフラボタンパク質であり、生体内では電子伝達系の構成酵素として機能している。この種の酵素は、酸化還元色素をメディエーターとして基質の電子を電極へ渡すことができるため、バイオセンサー素子として利用するのに好ましい性質を持っている。しかし膜結合性の酵素が多く、総じて不安定であり応用開発は遅れている。特に常温生物由来の Dye-DH は、精製が困難で機能・構造解析例も少ない。

我々は超好熱菌に、L-プロリン脱水素酵素（LPDH）、D-プロリン脱水素酵素および D-乳酸脱水素酵素を含むいくつかの Dye-DH を見出してきた。これらは常温生物由来の酵素と異なり非常に安定であり、総じて新規のフラビン含有脱水素酵素であった。このうち、色素依存性 L-プロリン脱水素酵素（LPDH）は、DCIP の存在下において L-プロリンから 1-ピロリン 5-カルボン酸を生成する反応を触媒する。超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* には、2 つの異なるタイプの LPDH（PDH1 と PDH2）が存在しており、この 2 種のホモログは、Euryarchaeota に属する超好熱アーキアに広く分布することが分かっている。PDH1 は $\alpha_4\beta_4$ のヘテロ 8 量体、PDH2 は $\alpha\beta\gamma\delta$ のヘテロ 4 量体構造をとる。我々は PDH1 の結晶構造解析に成功し、FAD、FMN、Fe、ATP を含むユニークな脱水素酵素であることを明らかにしている。一方、PDH2 の構造は未解明のままであった。今回、PDH2 の β サブユニットの結晶構造解析に成功したので報告する。

proline dehydrogenase, crystal structure, archaea

発表責任者：大志田達也（05tc16@gmail.com）

講演番号：2A21a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A21 会場

多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の構造安定性

Structural stability of a lytic polysaccharide monooxygenase, CBP21

○杉本 華幸、本山 彩香、片桐 絵里奈、渡邉 剛志、鈴木 一史（新潟大・農・応生化）
○Hayuki SUGIMOTO, Ayaka MOTOYAMA, Erina KATAGIRI, Takeshi WATANABE, Kazushi SUZUKI (Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agri., Niigata Univ.)

Serratia marcescens 多糖モノオキシゲナーゼ（CBP21）は，結晶性キチンのグリコシド結合を酸化分解する酵素で，CAZy データベースによる分類では Auxiliary Activities family 10 [AA10 (formerly CBM33)]に属する。本酵素により，キチナーゼが作用できるキチン分子鎖末端が新たに結晶性基質表面に生じるため，CBP21 はキチンバイオマス分解のブースター酵素として注目されている。

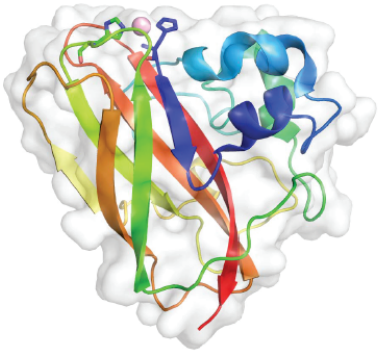


Fig. 1 Structure of CBP21
The metal ion is shown as a pink sphere. (PDB entry: 2bem)

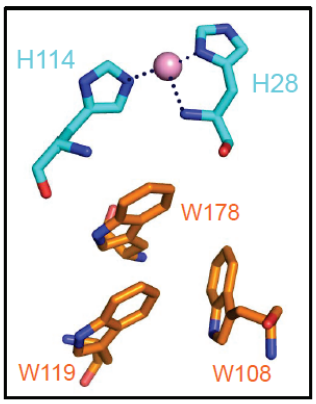


Fig. 2 Copper binding site (His brace) in CBP21 and three Trp residues in the vicinity of the binding site

CBP21 は 170 アミノ酸残基からなる小型球状タンパク質で，触媒部位に銅イオンが配位している（Figs. 1, 2）。本研究では，銅イオンが CBP21 の構造安定性におよぼす影響を，熱測定とトリプトファン蛍光を指標とした蛍光測定を用いて調べた。

アポ型 CBP21 と銅イオン（Cu^{2+}）の結合を等温滴定熱量測定により調べたところ，解離定数は 10 nM 以下であった（pH 5.0, 25℃）。熱変性反応を断熱型示差走査熱量測定により調べたところ，アポ型 CBP21 の変性温度は 65.3℃（pH 5.0）であった。他方，ホロ型 CBP21 の変性温度は 74.5℃で，アポ型に比べて 9℃増大した。タンパク質濃度に対して大過剰の銅イオンを共存させた場合でも CBP21 の変性温度はおよそ 75℃で，銅イオン濃度を増大させても変性温度は増大しなかった。また，尿素による変性剤変性においても，アポ型よりもホロ型の方が転移中点での変性剤濃度が高く，熱変性の場合と同様の結果が得られた。変性状態のアポ型 CBP21 に銅イオンを滴定したところ，トリプトファン残基の蛍光は徐々に消光され，変性状態においても銅イオンが結合することがわかった。

これらの結果から，CBP21 は銅イオンの結合により構造安定性が増大すること，また，銅イオンは変性しても解離しない（変性状態でも銅イオンが結合している）ことが明らかになった。

lytic polysaccharide monooxygenase, structural stability, copper ion

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A21a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A21 会場

スター活性が低下した変異型 EcoO109I 制限酵素と DNA 複合体の X 線結晶構造解析
X-ray crystal structural analysis of a high-fidelity mutant of EcoO109I restriction endonuclease in complex with cognate DNA
○渡邉 幸夫、三上 文三、喜多 恵子（京大院農）
○Yukio WATANABE, Bunzo MIKAMI, Keiko KITA (Kyoto Univ.)

【目的】
制限酵素は I 型から IV 型に分類され、II 型制限酵素は 4 から 8 塩基対の配列を認識し、DNA を切断する際に Mg^{2+}や Mn^{2+}などを補因子とする。II 型に属する EcoO109I は、溶液中で二量体を形成して 6 塩基対の DNA 配列(A/G)G／GNCC(C/T)を認識して切断する。先行研究において、野生型の単体と DNA 複合体の構造解析が行われ、認識配列の副溝が B 型 DNA よりも狭くなっていることが明らかにされている（１）。一般的に、制限酵素は、酵素を過剰に添加した場合や、高グリセロール存在下等では、通常の認識配列とは異なる配列を認識し切断するスター活性を示す。我々は、K74R 変異酵素は標準条件での活性に変化がないにもかかわらず、スター活性は低いという性質をもつことを見出している（２）。この原因を明らかにするため、変異酵素の DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行い、酵素の構造と DNA のコンホメーションについて野生型と比較した。
【方法と結果】
ヒスチジンタグを付加した変異型酵素を、ニッケルアフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、ヘパリンカラムで精製した。野生型の複合体で使用した EcoO109I の認識配列をもつ DNA と、変異型酵素の複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ、分解能 3.2Åの構造が得られた。複合体中のタンパク質の全体構造を比較すると、変異型は野生型単体のオープンな構造に近いことが明らかとなった。また、野生型はサブユニットの構造が互いに似ているのに対し、変異型ではわずかに異なることが明らかとなった。次に、それぞれの複合体中の DNA のコンホメーションの比較を行った。18 のパラメータについて比較したところ、すべてのパラメータに差があり、野生型と変異型では塩基対の距離や角度が異なることが明らかとなった。変異型では 2 本鎖 DNA は野生型よりも B 型 DNA に近づき、副溝は B 型 DNA よりも広がっていた。さらに、認識配列外の CG 塩基対の一つが、ワトソン・クリック型やフーグスティーン型ではない塩基対を形成していた。本研究において、スター活性が低下した変異型制限酵素の DNA 複合体の構造が初めて明らかとなった。
（１）JBC (2005) **280**, 5605
（２）日本農芸化学会 2007 年度大会講演要旨集

crystal structure, restriction endonuclease, DNA conformation

講演番号：2A21a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A21 会場

各種変異体を用いた人工酵素レトロアルドラーゼ RA61 の構造機能解析

Structural and functional analysis of *de novo* designed retro-aldol enzyme, RA61, and its mutants

○岡 実智子[1]、稲葉 理美[2]、沼本 修孝[3]、伊藤 暢聡[3]、ロイ プロディップ[4]、田中 富士枝[4]、織田 昌幸[1] ([1]京府大・院生環科、[2]高輝度光科学研究センター、[3]医科歯科大・難研、[4]沖縄科学技術大学院大)
○Michiko OKA[1], Satomi INABA[2], Nobutaka NUMOTO[3], Nobutoshi ITO[3], Prodip K. ROY[4], Fujie TANAKA[4], Masayuki ODA[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]JASRI/SPring-8, [3]Tokyo Med. Dent. Univ., [4]OIST)

【背景・目的】酵素は様々な生命活動に必要な化合物の合成や分解に関わっているが、天然の酵素では触媒できない反応に利用しうる人工酵素は、医薬品の開発や生体機能の解明等に役立つと考えられている。先行研究で、炭素-炭素結合の開裂に関わるレトロアルドール反応を触媒する人工酵素 (レトロアルドラーゼ; RA) が複数創製されており、その中でも特に RA61 の活性が高いことが報告されている。活性残基は Lys176 あるいは Lys48 で、水分子が触媒に関与すると考えられている。そこで、Lys176 を Ala に置換したレトロアルドラーゼ不活性型 K176A、アルドール活性の向上や基質特異性の変換を狙って活性部位周辺を変異させた各種変異体を発現、精製し、各蛋白質のアルドール反応とレトロアルドール反応の個々の活性を評価し、各部位の役割を明らかにすることを目的とした。さらに安定性や立体構造解析を行い、構造機能相関の解明を目指した。

【方法・結果】活性部位周辺の疎水性残基を親水性に変えた I72D、L89H、L89S、L89Y、そして不活性型 K176A 変異体を作製した。N 末端側に His-tag を付加した RA61 および各変異体を、大腸菌 BL21 株を用いて大量発現させ、Ni-NTA カラムで精製した。円二色性 (CD) 分散計を用いて、精製した RA61 の二次構造と熱安定性を評価した。結果、RA61 野生型および各変異体は、218 nm 付近に負の極大を示し、β-sheet rich な二次構造を取ることが示された。昇温に伴う 218 nm の CD 値の変化から算出した熱変性中点温度 T_m は、≈80°C であった。精製した RA61 の活性を評価するために、4-styrylbenzaldehyde や 4-hydroxy-4-(4styrylphenyl)butan-2-one を基質としたアルドール反応、レトロアルドール反応について、各反応生成物の蛍光測定を行なった。結果、レトロアルドール反応では野生型が最も高かった。一方、アルドール反応では野生型では活性が見られず、K176A、I72D、L89H、L89S、L89Y の順で活性が上昇した。I72D について、スロンビン消化により His-tag を除去した状態での結晶化を行い、結晶構造解析を行なったところ、分解能 1.1 Å の結晶構造が得られた。I72D 変異により、周辺の Trp178 側鎖のコンフォメーションが不安定化し、活性に影響を与える可能性が示唆された。

artificial enzyme, enzyme activity, crystal structure

発表責任者：織田昌幸（oda@kpu.ac.jp）

講演番号：2A21a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A21 会場

グリコサミノグリカンの輸送に関わる細菌タンパク質は二種類の基質結合型 closed 構造をとる
A bacterial protein involved in the import of glycosaminoglycans adopts two types of substrate-bound closed conformations

○老木 紗予子[1]、佐藤 賢宏[2]、蒲地 玲子[2]、三上 文三[1,2]、村田 幸作[3]、橋本 渉[1,2]（[1]京大院・農、[2]京大・農、[3]摂南大・理工）
○Sayoko OIKI[1], Masahiro SATO[2], Reiko KAMOCHI[2], Bunzo MIKAMI[1,2], Kousaku MURATA[3], Wataru HASHIMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】ある種の細菌は、動物と相互作用する際、宿主細胞外マトリックスの構成要素である酸性多糖グリコサミノグリカン（GAG）を定着や分解のための標的とする。細菌による GAG の細胞外での断片化および細胞内での分解・代謝機構の研究は進んでいるが、GAG の細胞内への輸送機構については不明な点が多い。これまでに、細菌による GAG 取り込み系として初めて、グラム陰性の病原性連鎖桿菌（*Streptobacillus moniliformis*）の基質結合タンパク質（Smon0123）依存 ABC トランスポーターを分子同定した。また、ABC トランスポーターに基質を受け渡す Smon0123 の X 線結晶構造解析により、Smon0123 が基質結合によって 2 つのドメインを閉じ、GAG 二糖の硫酸基数に応じて基質結合時の開閉度を変化させることを見出した。本研究では、他の基質結合タンパク質には見られない Smon0123 に特徴的な基質依存的開閉機構を生化学と構造生物学の観点から明らかにすることを目的とした。また、その成果に基づいて、Smon0123 による開閉度変化の生理的意義を考察した。
【方法と結果】GAG の一種であるコンドロイチン硫酸は、グルクロン酸と *N*-アセチル-D-ガラクトサミンの二糖を基本単位とし、構成糖に硫酸基を有する。その断片化二糖として、以下を使用した［CΔ0S（硫酸基数 0 個）、CΔ4S と CΔ6S（1 個）、CΔ4S6S（2 個）、および CΔU2S4S6S（3 個）］。CΔ0S、CΔ4S、および CΔ6S との Smon0123 結合体が基質非結合体と比べて 47°閉じた構造を示す一方で、CΔ4S6S との結合体における開閉度は 39°であり、この構造は硫酸基付近の塩基性残基の配置の違いに起因した。そこで、基質結合に伴う Smon0123 の蛍光変化の測定により、Smon0123 の CΔ4S6S との結合レベルを決定した。Smon0123 の CΔ4S6S に対する解離定数は 3.86 μM であり、他の基質と比較して親和性が低いことが分かった。また、Smon0123 の CΔU2S4S6S との結合性は見られなかった。ABC トランスポーターによる CΔ4S6S の取り込み能を調べるため、組換え大腸菌で発現させ精製した ABC トランスポーターをリポソームに再構成した。そのプロテオリポソームを用いて、Smon0123 存在下で CΔ4S6S を添加し ATPase 活性を測定した結果、CΔ4S6S による ATPase 活性の上昇率は低く、CΔ4S6S は他のコンドロイチン二糖よりも ABC トランスポーターによる取り込みに適さないことが示された。
【考察】すでに当研究室で構造決定した、*Sphingomonas* 属細菌 A1 株の酸性多糖アルギン酸取り込みに関わる基質結合タンパク質と ABC トランスポーターの複合体を基にホモロジーモデリングを行った。Smon0123 と CΔ4S6S との結合体は ABC トランスポーターとのドッキングに適しておらず、開閉度変化により輸送に適さない基質の取り込みを防ぐと考えられる。

glycosaminoglycan, solute-binding protein, ABC transporter

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A21a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A21 会場

pH dependency of iron coordination by TtFbpA, a periplasmic iron-binding subunit of ABC-type transporter from Thermus thermophilus HB8, analyzed by solution NMR

○Peng Lu[1], Kobayashi Yoshiki[1], Mimin Zhang[1], Yi Lu[1], Yukie Katayama[1], Michio Suzuki[1], Etsuro Yoshimura[1,2], Koji Nagata[1] ([1]The University of Tokyo, [2]The Open University of Japan)

[Background and Objectives]

Iron is one of the vital elements in living organisms and the way of absorbing iron from the environment varies a lot. In Gram-negative bacteria, the ATP-binding cassette (ABC) transport system is involved in the iron uptake. A typical iron-uptake ABC transporter basically consists of three subunits, namely the iron-binding subunit (FbpA) in the periplasm, the transmembrane subunit (FbpB) in the inner membrane bilayer and the nucleotide-binding subunit (FbpC) in the cytoplasm. Subunit B and C are highly conserved among the ABC transporters, however, FbpA can be exclusively found in Gram-negative bacteria. In our previous study, we have determined the crystal structure of the FbpA subunit from *Thermus themophilus* HB8 (TtFbpA). This crystal structure of TtFbpA at pH 5.2 shows a six-coordinated form of iron binding with three tyrosine residues, one water molecule, and two bicarbonates. Another crystal structure of TtFbpA at pH 7.5 was reported, which shows a five-coordinated form of iron binding with three tyrosine residues and one carbonate. These two different structures suggest that the iron-coordination manner could be influenced by pH conditions. The objective of this study is to analyze the iron-coordination manner of TtFbpA at different pH conditions in solution to further understand the mechanism of iron-uptake in Gram-negative bacteria, which will give rise to a new conception of anti-bacteria drug design.

[Methods and Results]

TtFbpA was overexpressed in *E. coli* and purified as reported. The last purification step was performed by the size exclusion chromatography under several pH conditions ranging from pH 5.0 to 9.0 in the presence or absence of Fe^{3+} ion. 2D NOESY spectra of TtFbpA with or without Fe^{3+} at pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 were measured. The cross-peaks of tyrosine side chains were hardly observed in the absence of Fe^{3+}. However, some of these signals became observable by the addition of Fe^{3+}, suggesting that these tyrosine signals could be involved in Fe^{3+} coordination. The chemical shifts of these tyrosine signals were pH-dependent. The chemical shifts at pH 5.0 and 6.0 were prominently different from those at pH 7.0, 8.0 and 9.0. These results explain the different coordination modes of Fe^{3+} in the two crystal structures of TtFbpA at pH 5.2 and 7.5. These pH-dependent Fe^{3+} coordination modes of TtFbpA are probably based on the pH-dependent equilibrium of bicarbonate and carbonate ions.

ABC transporter, iron-uptake, NMR　spectra

発表責任者：永田　宏次（aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A21a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A21 会場

麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の液中における単量体・多量体の性質と挙動

Monomeric and multimeric characteristics of hydrophobin RolA of *Aspergillus oryzae* in aqueous solution

○大沢 千晶、田中 拓未、吉見 啓、七谷 圭、阿部 敬悦（東北大院農）
○Chiaki OSAWA, Takumi TANAKA, Akira YOSHIMI, Kei NANATANI, Keietsu ABE (Tohoku Univ.)

【背景・目的】hydrophobin は糸状菌の細胞壁表面に局在する界面活性蛋白質であり、気中菌糸形成や固体高分子への菌糸接着など、形態形成に深く関与することが知られている。我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA がポリエステル表面に吸着し、ポリエステラーゼをポリエステル表面へ濃縮する現象を見出した(1)。また、 RolA が動物の免疫応答を回避する性質も見出し、動物の細網内皮系からの捕捉を回避する医療用 RolA 被覆ナノ粒子への応用を試みてきた(2)。これらの RolA の特性は、RolA が固体表面上で自己組織化構造を形成することで発現すると思われる。しかし、一定の自己組織化構造を再現性よく形成させるためには、RolA が液中でどのような状態で安定化しているか等の基礎的な知見が未だ乏しい。そこで本研究では、液中における RolA の性質解明を目的とした。
【方法】RolA は *A. oryzae* を宿主とした組み換え体として発現し、培養液から、硫安沈殿とカラムクロマトグラフィーによって精製した(1)。精製 RolA を pH4, 7, 10 のバッファーに 50, 300, 1000 μg/ml の濃度で溶解させ、SDS-PAGE 及び Native PAGE に供した。同時に、各条件下でグルタルアルデヒドを用いて RolA 多量体を架橋形成させた検体や、ボルテックス処理により RolA の多量体化を促進させた検体も作製し、SDS-PAGE に供した。 PAGE 後、 Western blot 及び銀染色によって RolA を検出し RolA の多量体形成を定性的・定量的に評価した。
【結果・考察】Native PAGE の結果、RolA は pH 及び RolA 濃度条件には依存せず、主に 4 または 5 量体で存在することが明らかとなった。しかし、 SDS-PAGE からは RolA の大部分がモノマーであり、一部が 2~5 量体を形成している結果が得られた。ここから、RolA は液中において主に 4 または 5 量体で安定化しているが、 SDS でモノマーへ解離する程度に会合していることが推察された。また、ボルテックス処理した検体は Native PAGE ではバンドが確認されなかったが、SDS-PAGE ではモノマーが確認された。このことより、ボルテックス処理により Native PAGE では 10~20 % アクリルアミドグラジエントゲル中を泳動できない巨大な多量体が形成されたと思われるにも関わらず、形成された多量体は SDS でモノマーへ解離する程度のものであることが推察された。以上の結果より、 RolA は比較的容易かつ可逆的に会合・解離する hydrophobin であり、液中において主に 4 または 5 量体として安定化していることが示唆された。

(1) Takahashi T. et al. *Mol Microbiol* 96:14, 2015
(2) 阿部敬悦ら、特願2013-528956 (2012)

hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, self-assembly

講演番号：2A21a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A21 会場

アポリポプロテイン E によるピロール化タンパク質の制御

Regulation of pyrrolated protein by apolipoprotein E

○平出 直哉[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[2] ([1]名大院・生命農、[2]東大院・農学生命)
○Naoya HIRADE[1], Takahiro SHIBATA[1], Kouji UCHIDA[2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景】

全身性エリテマトーデス（SLE）は自己免疫疾患の一種であり、DNA に対して交差性を示す自己抗体の産生が大きな特徴として知られている。これまで当研究室において、SLE モデルマウス由来自己抗体と交差性を示す翻訳後修飾としてタンパク質リジン残基におけるピロール化を見出してきた。これまでの検討で、ピロール化タンパク質はヒトやマウスの血清中に存在することが確認されている。我々は、血清中にピロール化タンパク質と相互作用する分子が存在すると予想し、ヒト血清を用いたプルダウンアッセイを行ったところ、ピロール化タンパク質と相互作用する血清分子として apolipoprotein E (apoE) が同定された。apoE はリポタンパク質の構成タンパク質として知られるが、肝細胞だけでなく生体内の幅広い組織の細胞から産生されることが知られており、リポタンパク質代謝の制御以外にも様々な機能が存在すると考えられる。そこで本研究では、apoE とピロール化タンパク質の相互作用がどのような意義を持つのかを明らかにすることを目的として検討を進めることとした。

【方法・結果】

我々は apoE がピロール化タンパク質のクリアランスに関与しているのではないかと予想し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた取り込みアッセイを行った。蛍光標識したヒト血清アルブミン(HSA)を 1,4-butandial と 24 時間 37 ℃でインキュベーションしピロール化 HSA を作製した。このピロール化 HSA を RAW264.7 に投与し、蛍光顕微鏡による観察および蛍光強度の測定を行い細胞による取り込みを評価した。その結果、未修飾 HSA と比較して、ピロール化 HSA が有意に取り込まれることを明らかにした。そして同様のアッセイにより、apoE を加えた場合に RAW264.7 によるピロール化タンパク質の取り込みがさらに増強されるという結果が得られた。また、加えた apoE のアイソフォームによってピロール化タンパク質の取り込みに違いが確認され、免疫染色の結果からこの違いは各 apoE アイソフォームとピロール化タンパク質の相互作用の強さが異なるためであることが示唆された。このように apoE がピロール化タンパク質のクリアランスに影響を与える可能性を示唆する結果が得られたため、現在その分子メカニズムの解析を含めさらなる検討を進めている。

Post-translational modification, Pyrrole, apolipoprotein E

講演番号：2A21p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A21 会場

次世代シーケンスによる逆転写酵素の正確性の解析

Next-generation sequencing-based analysis of reverse transcriptase fidelity

○保川 清[1]、飯田 慶[2]、岡野 啓志[1]、秀瀬 涼太[3]、馬場 美聡[1]、柳原 格[4]、兒島 憲二[1]、滝田 禎亮[1]、藤原 伸介[3]（[1]京大院農、[2]京大院医、[3]関西学院大、[4]大阪母子医療セ）
○Kiyoshi YASUKAWA[1], Kei IIDA[2], Hiroyuki OKANO[1], Ryota HIDESE[3], Misato BABA[1], Itaru YANAGIHARA[4], Kenji KOJIMA[1], Teisuke TAKITA[1], Shinsuke FUJIWARA[3] ([1]Grad Sch Agric, Kyoto Univ., [2]Grad Sch Med, Kyoto Univ., [3]Kwansei-Gakuin Univ., [4]Osaka Women's and Children's Hospital)

【目的】核酸合成酵素の正確性は、エラー率（誤ったヌクレオチドを取込む確率）で評価される。標準的なエラー率の測定法は、ファージの 2 本鎖環状 DNA の一部分（β-ガラクトシダーゼ遺伝子の一部）が 1 本鎖となったものを鋳型として完全な 2 本鎖環状 DNA を合成したときに導入された変異を、プラークの色で判定する方法（青白プラーク法）である。この方法は、変異が入っても必ずしも酵素活性が消失しないこと、色の判別が主観的になる等の欠点をもつ。本研究では、次世代シーケンス（NGS）により逆転写酵素（RT）による cDNA 合成反応のエラー率を求める方法の開発を試みた。
【方法】１．酵素：5種類（①ヒト免疫不全ウイルス I 型（HIV-1）由来 RT、②4アミノ酸残基への変異導入により耐熱性が向上したモロニ―マウス白血病ウイルス由来RT変異体（MM4）[1)]、③16アミノ酸残基への変異導入によりRT活性を獲得した超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis* 由来ファミリーB DNAポリメラーゼ変異体（RTX）[2)]、④Leu329→AlaによりRT活性を獲得した好熱性細菌*Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ変異体（K4pol$_{L329A}$）[1)]、⑤*T. kodakarensis*スーパーファミリー2 由来DNA/RNAヘリカーゼ（*Tk*-EshA）[1)]）を大腸菌で発現させ、菌体から精製した。２. cDNA合成反応：RNAは、嘔吐型セレウス菌のセレウリド合成遺伝子*cesD*のmRNAの一部（419塩基）を合成したものを用いた。プライマーは、RNAとアニールする領域の5’側上流に14塩基のランダム配列をバーコードとして有するものを用いた。反応は50℃で30分間行った。３. NGS：シーケンサーはIon Proton Sequencer（Thermo Fisher Scientific）を用いた。解析は、同一バーコードを有する配列が5種類以上得られたリードを対象とした。同一バーコードを有するリードのすべてに導入された変異はcDNA合成時のエラー、一部に導入された変異はNGSのエラーとみなした。
【結果と考察】各反応について平均3.6×10^{6}塩基を解析した。cDNA合成反応で2～49番目に取り込まれた塩基のエラー率（errors/base）は、HIV-1 RTでは2.6×10^{-4}、MM4では1.0×10^{-4}、RTXでは7.5×10^{-5}、MM4、K4pol$_{L329A}$、*Tk*-EshAの組み合わせでは1.1×10^{-4}であった。1番目の塩基のエラー率はこれの200−400%であった。全変異の92%が置換、3%が挿入、5%が欠失であった。酵素の種類により、変異の種類や位置が異なった。本方法は各種条件下でのRTの正確性の評価に有用であると思われる[3)]。

【文献】1. H. Okano et al. *Enzyme Microb. Technol.* **96**, 111−120 (2017)
2. J.W. Ellefson et al. *Science* **352**, 1590–1593 (2016)
3. K. Yasukawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**, 147-153 (2017)

error rate, next-generation sequencing, reverse tranpscriptase

発表責任者：保川清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A21p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A21 会場

機械学習とネットワーク解析を使用した腸内細菌叢変動の解析
Exploring the Impact of Food on the Gut Ecosystem Based on the Combination of Machine Learning and Network Visualization

○嶋 秀明[1]、益田 静香[1]、伊達 康博[2,3]、篠 阿弥宇[2]、坪井 裕理[2]、梶川 瑞穂[1]、井上 能博[1]、金本 大成[1]、菊地 淳[2,3] ([1]昭和薬科、[2]理研、[3]横市大)
○Hideaki SHIMA[1], Shizuka MASUDA[1], Yasuhiro DATE[2,3], Amiu SHINO[2], Yuuri TSUBOI[2], Mizuho KAJIKAWA[1], Yoshihiro INOUE[1], Taisei KANAMOTO[1], Jun KIKUCHI[2,3] ([1]SPU, [2]RIKEN, [3]YCU)

【背景と目的】

プレバイオティクスやプロバイオティクスは腸内細菌叢変動を伴い腸管内の環境を変えることで、摂食者の健康等に影響を与える。しかしながら、腸内細菌叢の構成は毎日の食事によって変動し続けている。これは、プレバイオティクスやプロバイオティクスと考えられていない、通常の腸内細菌叢への影響が小さい食品を用いても、日々の食事によって腸内細菌叢変動を制御可能である事を示唆している。しかしながら、この小さな変動は、高感度な検出法の欠如によって無視されてしまっている。

本研究は、腸内細菌叢の構成や、腸内細菌叢由来代謝物の次世代シーケンサーや NMR 等を用いた網羅的な情報に対し、Random forest という機械学習法と、ネットワーク解析を併用する事で、小さな変動を検出し、かつ、腸管環境の機能的なモジュールを見出す高感度な解析方法の構築を目的とした。

【方法】

世界中で採取可能な植物として、*Pteridium aquilinum* (ワラビ)と *Matteuccia struthiopteris*(コゴミ)を用いた。どちらの植物もシダ類に分類され、陸上植物と藻類との中間の成分をもつため、陸上植物よりも比較的網羅的な解析を行いやすい。調理済みのワラビ・コゴミを凍結乾燥させ、ヒト換算で一食分程度を生理食塩水に懸濁し、マウスに週 3 回、計 6 回投与した。また、対照群にはセルロース懸濁液を投与した。投与期間前後 2 週間を含む 6 週間の糞便や尿を採取し、次世代シーケンサーや NMR を用いて網羅的に腸内細菌叢及び代謝物を測定し、当該データは R を用いて解析した。

【結果と考察】

Random forest による解析によって、ワラビ、コゴミを摂食した際に他群と分類する上で重要な菌を見出すことが出来た。また、ネットワーク解析を行うことで、当該菌種と機能的モジュールとの相関をもつ代謝物群を見出すことに成功した。

本結果から、機械学習を用いた菌叢解析法が、腸内細菌叢の小さな変動の検出に有用であることが示された。また、ネットワーク解析法を組み合わせることで、直接的に検出されない機能的なモジュールを見出す、新規解析手法が構築された。

gut ecosystem, machine learning, food intake

講演番号：2A21p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A21 会場

CIRSPR/Cas9 を利用した *Geobacter Sulfurreducens* における効率的な複数遺伝子破壊株作製法の確立

Multiple gene deletion on *Geobacter Sulfurreducens* by CRISPR/Cas9

○藤川 昂、井上 謙吾（宮崎大学）
○TAKASHI FUJIKAWA, KENGO INOUE (University of Miyazaki)

【背景】*Geobacter sulfurreducens* は、代謝で生じる電子を体外の電極へ効率よく渡すことができるため、微生物燃料電池で高い発電能力を有する。これまで、標準株である PCA 株を対象とした分子生物学的手法による研究によって、細胞外電子伝達に関わるいくつかの遺伝子が同定されてきた。当研究グループは、PCA 株に比べて高い発電能力を持つ *G. sulfurreducens* YM18 株を単離し、その発電効率の違いを分子レベルで解明することを目的として研究を行っている。

細菌が持つ免疫機構である CRISPR/Cas システムは、その特異性の高さや、簡便さから、真核生物における遺伝子改変技術として広く応用されている。PCA 株が CRISPR/Cas3 を保持する一方で、YM18 株は CRISPR/Cas 系を遺伝子配列レベルでは保持していないことが明らかになった。これまで PCA 株で行われてきたノックアウト法では、複数の抗生物質耐性遺伝子の挿入が必要であることなど、複数の遺伝子を破壊することが技術的に難しかった。そこで、本研究では、YM18 株の CRISPR/Cas システムを持たないという特徴を利用し、本株の複数遺伝子を同時に破壊する方法の構築を目的とした。

【方法と結果】PCA 株においてシュードジーンとして明らかにされている遺伝子のオーソログである *YM18_2317* 遺伝子に pCas9 由来 *cas9* 遺伝子をノックインした株を作製した。*YM18_2317* の上流側の配列と下流側の配列の間にカナマイシン耐性遺伝子と *cas9* 遺伝子が挟まれるようにデザインされた配列を持つ線状 DNA を作製し、エレクトロポレーション法によって YM18 株に導入することで、*cas9* 遺伝子がノックインされた YM18 株を作製し、YCS 株と命名した。PCA 株においては *c* 型シトクロムの 1 つである *OmcZ* 遺伝子が破壊されると著しく微生物燃料電池での発電能力が低下することが知られている。そこで、*omcZ* のオーソログ（*YM18_2051*）をターゲットとする gRNA 発現ベクターを作製し、YCS 株にトランスフェクションした。現在、導入した CRISPR/Cas9 システムによって、*omcZ* が破壊された YM18 株について、*omcZ* 遺伝子の塩基配列、および、YCS 株の発電能力を調べている。また、複数遺伝子をターゲットとした gRNA を発現するベクターも作製しており、この gRNA を用いることで、複数の遺伝子を同時に欠損させることができるかどうか検証も行っている。

Extracellular Electron Transfer, Anaerobic bacteria, CRISPR/Cas

発表責任者：藤川昂（ac16023@student.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A21p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A21 会場

部位特異的非天然アミノ酸導入を応用した厳密な翻訳調節法
Tight control of translation using site-specific unnatural amino acid incorporation
○加藤 祐輔（農研機構・生物機能）
○Yusuke KATO (NIAS, NARO)

生体直交性の非生体物質により、厳密に遺伝子発現を制御する系は、成功する人工的な遺伝回路を構築するために、強く望まれている。私たちは、大腸菌において、アンバー終止コドンに対する部位特異的非天然アミノ酸導入系を応用した、高度に厳密な翻訳スイッチを構築した。この翻訳スイッチは、細胞外に与えられる非天然アミノ酸のみにより、標的遺伝子の産物の翻訳を、特異的に制御する。また、正のフィードバックを伴う脱抑制遺伝回路によって、OFF 状態におけるスイッチ由来の漏えい翻訳レベルが著しく抑制されている。細胞外に非天然アミノ酸を加えて ON 状態にした時の翻訳効率は、フィードバック回路導入前において OFF 状態の 4.2 倍だったのに対して、最適化した回路を導入した翻訳スイッチでは厳密な発現調節系として広く用いられている P_{BAD}-araC に匹敵する 10^3 倍を得た。また、ON 状態／OFF 状態の遷移は、可逆的だった。さらに、非天然アミノ酸の濃度の調節によって、中間的な翻訳効率を得ることができる、調節可能な翻訳コントローラーとしても機能した。この翻訳スイッチ／コントローラーは、非天然アミノ酸依存性を利用した生物学的封じ込め、弱毒化した細菌およびウィルスによる生ワクチンの製造、代謝工学における精密な遺伝子発現の制御などに、応用が期待できる。

translation, unnatural amino acids, synthetic biology

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

講演番号：2A21p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A21 会場

固相誘導体化法を用いた GC/MS メタボロミクス分析法の開発

Development of GC/MS metabolomics analysis method by using solid phase derivatization

○新川 翔也[1]、笹々野 僚一[2]、古野 正浩[1]、福崎 英一郎[1] ([1]阪大院工、[2]アイスティサイエンス)
○Shoya Arakawa[1], Ryoichi Sasano[2], Masahiro Furuno[1], Eiichiro Fukusaki[1] ([1]Osaka Univ., [2]AISTI Science)

ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC/MS）によるメタボロミクス分析においては、誘導体化（トリメチルシリル化）が必要不可欠である。しかしこれらの誘導体化物は不安定であり、オートサンプラーでの待機時間中に他の化合物へと変化するため、GC/MS を用いた多検体分析において大きな問題となっている。それに加えて、サンプル抽出→遠心濃縮→凍結乾燥→誘導体化といった煩雑な前処理工程を行う必要があり、各工程で誤差が蓄積されるため、作業者の技量がデータの質に大きく反映される。この課題を解決するために、我々は固相誘導体化法を用いたオンライン GC/MS システムを提案している。本発表では当システムの概要に加え、前処理としての従来法と固相誘導体化法を比較した当該メソッドの有用性について報告する。

固相誘導体化法を用いた前処理手順は以下のとおりである。サンプルとしてヒト血漿を用いた。はじめに血漿サンプルに抽出溶媒（水およびアセトニトリル）を加え、その抽出溶液を陽イオン・陰イオン交換複合固相担体に注入し、有機酸・アミノ酸・糖類などを保持させた。20%水/アセトニトリル溶液で糖類を除去した後、残存水をアセトニトリルで除去した。その後 N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）を含浸させ、固相上で誘導体化反応を行った。最後にヘキサンで溶出し、この溶出液を用いてサンプル分析を行った。当手法におけるサンプル抽出後から GC/MS 分析開始までの前処理時間は約 10 分であった。これは従来法での処理時間（10 時間以上）と比較して非常に短い処理時間であった。前処理時間の短縮により GC/MS のバッチ分析中に誘導体化を行うことが可能となり、誘導体化後の待機時間をゼロに統一することができる。また、当手法を用いて標準試料およびヒト血漿による分析再現性を評価したところ、測定代謝物のイオン強度における RSD は 20%以下でありいずれも良好であったことから、固相誘導体化法の有用性が示された。

metabolomics, GC/MS, derivatization

講演番号：2A21p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A21 会場

細径モノリスカラムを用いた高感度プロテオミクスとその感度評価

High-sensitive proteomics with small diameter monolithic columns and its evaluation of function

○大谷 優太[1]、藤井 温子[1]、油屋 駿介[1,2]、水口 博義[3]、三浦 夏子[1]、青木 航[1]、植田 充美[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]日本学術振興会、[3](株)京都モノテック）
○Yuta Ohtani[1], Atsuko Fujii[1], Shunsuke Aburaya[1,2], Hiroyoshi Minakuchi[3], Natsuko Miura[1], Wataru Aoki[1], Mitsuyoshi Ueda[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]Kyoto Monotech)

[背景と目的]
従来の細胞集団を用いた解析ではタンパク質としての発現量はその細胞集団の総和として認識されるため、より精密な解析では 1 細胞レベルでの分析が求められる。しかし、1 細胞に含まれるタンパク質の量は非常に少ないため、分析においてさらなる検出感度の上昇が必要である。プロテオミクスにおける一般的な分析法は、液体クロマトグラフィ（LC）とタンデム質量分析計（MS/MS）を組み合わせた nano LC-MS/MS によるものである。通常、検出感度を上昇させるためには、多くのタンパク質を含む生体試料を十分に分離し、様々なペプチド断片との共溶出を避けることで、MS での同定および定量の質を向上させることが可能である。当研究室で独自に開発を進めるモノリスカラムは、網目状の構造を持ち、通液性が高いためメートル長カラムを作製できる。そのため、従来の粒子充填型カラムと比較して、理論段数ベースで 100 倍以上の分離能を持つことから、複雑な生体試料を分析する際にもイオン化抑制を回避し、正確な同定と定量を実現できる [1]。しかし、さらに高感度化するためには、対象物質の濃縮なども必要である。そこで、本研究ではこのモノリスカラムを細径化することで、タンパク質分析においてさらなる検出感度の上昇を目指した。

[方法と結果]
一般的にカラムは細いほど対象物質が濃縮され、イオン化効率が上がるため、感度が上昇する。そのため、内径が 100 μm、75 μm、50 μm の細径モノリスカラムを用意し、これらをプロテオミクスに適用することで分析の高感度化を目指した。細径モノリスカラムを繋いだ LC に三連四重極型質量分析計を連結し、ウシ血清アルブミン（BSA）消化物を標品とし分析した。BSA をトリプシン処理したペプチド断片を分析し、その中からイオン化効率の高い 10 個のペプチドを対象とし SRM 法を最適化することで、分析条件を構築した。BSA 消化物の希釈系列を作製し、最適化した SRM 法を用いてこれらを分析することで各々のペプチドの検出限界を割り出し、細径モノリスカラムの検出感度上昇を評価したのでまとめて報告する [2]。

[1] Morisaka et al., *AMB Express*, 2, 1-5 (2012)
[2] Ohtani et al., submitted.

proteomics, monolithic column, nano LC-MS

講演番号：2A21p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A21 会場

高感度かつ再現性の高い代謝物局在解析を可能とする質量分析イメージングに向けた新たな試料調製法の開発

Development of new sample preparation method of mass spectrometry imaging for metabolite localization analysis with higher sensitivity and reproducibility

○一瀬 智美[1]、藤村 由紀[1]、山崎 雄三[2]、割石 博之[1]、三浦 大典[1] ([1]九州大学、[2]島津製作所)
○ Tomomi ICHINOSE[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Yuzo YAMAZAKI[2], Hiroyuki WARIISHI[1], Daisuke MIURA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Shimadzu Corporation)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング (MALDI-MSI) は組織上の生体分子を非標識で捉え、その分布情報を質量／電荷比 (*m/z*) に基づいて直接検出可能な分子マッピング法である。本技術は、内在性代謝物、タンパク質、脂質、薬剤などの組織内代謝動態の革新的可視化ツールとして、動植物を問わず広く活用が進みつつある。本手法では、組織における対象化合物の検出（イオン化）を補助する低分子化合物（マトリックス）の塗布条件の選択が MALDI-MSI による対象化合物の検出感度・空間分解能・実験の再現性に極めて大きな影響を与える。現在、マトリックス塗布法としてスプレーコーティング法や蒸着法が汎用されている。スプレーコーティング法ではエアブラシや自動塗布装置が用いられているが、前者では手動による実験者の熟練の技術を要するために再現性が悪く、また、後者では検出感度の低さが問題点となっている。一方、蒸着法（真空加熱でマトリックスを昇華させて試料表面に薄膜を形成させる方法）では自動蒸着装置を用いるが、マトリックスの薄膜形成時に溶媒を含まず、組織からの代謝物溶出工程が無いため、検出感度が低くなるという欠点を有する。そこで本研究では、MALDI-MSI による簡便かつ再現性よく高感度な代謝物分布画像の取得を目的として、その技術的ボトルネックであるマトリックス塗布条件の最適化を試みた。

組織試料としてマウス脳矢状断面凍結薄切片（10 μm）、マトリックスとして我々が高感度代謝物分布解析に有用であることを見出してきた 9-aminoacridine を使用した。マトリックス塗布方法として、従来のスプレーコーティング法および蒸着法に加え、蒸着後に有機溶媒を用いたマトリックス再結晶化処理を行い、三者間での代謝物イメージングの結果を比較検討した。スプレーコーティング法では、核酸誘導体・アミノ酸・脂質に該当する代謝物分布画像を取得できたが、高い再現性を示さなかった。これに対して、蒸着法では再現性は改善されるが、代謝物ピークの強度が弱く、高感度な分布画像が得られなかった。一方、蒸着後のマトリックス再結晶化工程に最適な溶媒濃度および処理温度を検討したところ、60℃で気化させた 5%メタノール蒸気下で蒸着後の試料を処理することで、上述の内在性代謝物の高感度かつ再現性の高いイメージング結果が得られた。これは、組織上でマトリックスと代謝物の共結晶化が促進され、イオン化効率が向上したことによるものと推察している。

本技術は、MALDI-MSI における従来のマトリックス塗布法の欠点を克服すると共に、異なる生物種また他のマトリックスにも応用可能であり、対象化合物の組織内分布情報に基づいた生理的意義の理解や代謝動態解明の一端を担う基盤技術となることが期待される。

Mass spectrometry imaging, Metabolite localization analysis, Spatiotemporal information

発表責任者：一瀬智美（ichinose226@gmail.com）

講演番号：2A21p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A21 会場

緩和時間計測データと機械学習に基づく代謝プロファイリング技術の構築

Metabolic profiling based on relaxation time with machine learning

○伊達 康博[1,2]、魏 菲菲[1]、坪井 裕理[1]、清水 智子[1]、坂田 研二[1]、菊地 淳[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○Yasuhiro Date[1,2], Feifei Wei[1], Yuuri Tsuboi[1], Tomoko Shimizu[1], Kenji Sakata[1], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景】
メタボロミクスは、生体由来の複雑な代謝混合物を一斉に検出・解析することができる有用なツールであり、MS や NMR を利用したメタボロミクス研究の実施例は近年急激に増加している。NMR を用いたメタボロミクスでは、短時間で多検体を計測することが可能な ^{1}H NMR スペクトルを用いた研究が一般的に実施されているが、NMR によって得られた計測情報の中には、生体試料中に含まれる代謝物の種類や量、割合のみならず、生体中の高分子とその周辺に存在する分子との結合や分子間相互作用等に関する情報も含まれている。そこで我々は、これらの結合や相互作用等に関する情報を有効活用することで、生体サンプル中の物質と物性を同時に捉えることが出来るのではないかと考え、より高度な NMR メタボロミクス技術の開発を進めている。その一端として本研究では、魚類の筋肉中に含まれるたんぱく質と水分子との相互作用を緩和曲線から解析することにより、魚類の種類や生息域に関する特徴抽出が可能なデータマイニング技術の開発を試みた。
【方法】
日本沿岸・河口域等から採集した多種多様な魚類の筋肉サンプルから各種 NMR 装置を用いて通常の ^{1}H NMR スペクトルおよび T_2 緩和時間を計測した。得られた緩和曲線は逆ラプラス変換処理を施した後に数値化し、機械学習等の解析に供試した。各種機械学習の計算については、多様な“R”パッケージと自作プログラムを用いて行った。
【結果】
多種多様な魚類筋肉に対して ^{1}H の T_2 緩和時間を計測し、逆ラプラス変換処理を施した緩和曲線データに対して主成分分析等の多変量解析やランダムフォレスト等の機械学習による解析を行った結果、魚類の種に関する情報や、生息域に関する特徴的な情報を抽出することが可能であった。このことから緩和曲線データは、通常のメタボロミクス研究の様に産地判別技術等として利用できる可能性が示唆された。また、緩和曲線という比較的単純なデータは、安価な NMR 装置（例えば永久磁石等を用いたデスクトップ型 NMR 装置）を用いても、高性能な NMR 装置とほぼ同質のデータが得られることから、携帯型装置を用いた現場評価等に向いていると我々は考えている。そこで我々は、当研究室で所持しているデスクトップ型を含む NMR 装置間において、機械学習を用いた緩和曲線データの比較解析も行っており、得られた最新の知見についても本会で議論したい。

data mining, metabolomics, relaxation time

講演番号：2A21p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A21 会場

拡散 NMR と演繹的手法による代謝物群の *in silico* 同定法の高度化

Advanced *in silico* identification method for metabolic mixture by diffusion NMR with deductive approach

○伊藤 研悟[1,2]、坪井 裕理[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農）
○ Kengo ITO[1,2], Yuuri TSUBOI[1], Yasuhiro DATE[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】生物由来の成分を有効活用する上で、代謝物群の包括的な検出と同定、構造及び物性の評価は極めて重要である。NMR は代謝混合物の包括的な検出が可能であり[1]、得られた実測値を現代物理学的アプローチである量子化学に基づき算出された理論化学シフト及び理論スピン結合定数と比較することにより、既知・未知代謝物群の同定及び構造評価が可能となってきている[2]。一方で、脂質などの類似の化学構造を有する成分は、他成分とシグナルが重複するため、化学シフトやスピン結合定数のみで完全にシグナル分離及び同定することは困難である。そこで本研究では、非侵襲的なシグナル分離や同定、物性評価に有用な拡散 NMR 実験と古典力学的手法を用いて、代謝混合物の *in silico* 同定法の高度化を試みた。
【実験方法】20 種類のアミノ酸・有機酸・単糖標品混合物を水溶媒、7 種類の脂質標品混合物をメタノール溶媒にそれぞれ溶解させ、方法論構築用のサンプルとして供した。代謝物群の拡散現象を観測するため、PSYCHE-DOSY、INEPT-DOSY 及び HSQC-iDOSY の NMR 計測を行った。得られたスペクトルは拡散次元の逆ラプラス変換（NNLS 法、ITAMeD 法、TRAIn 法）[3]を行うとともに、ブラインド音源分離（MCR-ALS 法、NMF 法、NNSC 法）[4]を行った。これらの分離法は、当研究室で開発されたピーク分離の Web ツールである PKSP (http://dmar.riken.jp/shiny/PKSP/) を用いた。2 つに分解された行列から、単一の代謝物シグナルへの分離・同定能の評価と各代謝物の自己拡散係数の実験値の取得を行った。また、Einstein-Stokes の改良式[5]を用いて、自己拡散係数の理論値を算出し、実験値と比較することで、混合物中の代謝物の同定と物性評価を行った。
【結果・考察】本研究では、3 種類の DOSY パルスプログラムを使用し、最も一般的に使われている ^{1}H-DOSY よりも高分解能なスペクトルを得ることが可能であった。逆ラプラス変換とピーク分離法を組み合わせることで、代謝混合物のシグナル分離能が向上した。算出した拡散係数の理論値の順位付けを行い、実測値と比較することで定性的に同定と物性評価が可能であった。量子化学計算と古典力学的手法のアプローチを援用し、化学シフト・スピン結合定数・自己拡散係数の理論値と実測値を比較することで、生体試料の多様な代謝物の *in silico* 同定が可能となることが示唆された。
【参考文献】[1] Kikuchi, J., et al. *Prog. NMR Spectrosc.* (in press). [2] Ito, K., et al. *ACS Chem. Biol.* 11, 1030–8 (2016). [3] Xu, K., et al. *Anal. Chem.* 86, 592−9 (2014). [4] Wei,F., et al. *Anal. Chem.* 87, 2819–26 (2015). [5] Evans, R., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 3199–202 (2013).

DOSY, signal analysis, physical property evaluation

発表責任者：伊藤研悟（kengo.ito@riken.jp）

講演番号：2A21p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A21 会場

高・低分子混合物の NMR シグナル帰属能向上を目指した InterSpin ツール開発

Development of integrated webtool, InterSpin toward advanced NMR signal assignment performance

○山田 隼嗣[1,2]、伊藤 研悟[2,3]、黒谷 篤之[2]、山田 豊[2]、近山 英輔[2,4]、菊地 淳[1,2,3]（[1]名大院生命農、[2]理研環境資源、[3]横市大院生命医、[4]新潟国情大情報文化）

○ Shunji YAMADA[1,2], Kengo ITO[2,3], Atsushi KUROTANI[2], Yutaka YAMADA[2], Eisuke CHIKAYAMA[2,4], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Nagoya Univ. Grad. Sch. of Bioagri. Sci., [2]RIKEN CSRS, [3]Yokohama City Univ. Grad. Sch. of Med. and Life Sci., [4]Niigata Univ. of Int. and Info. Stud. Dep. of Info. Sys.)

【背景と目的】NMR は生物学的抽出物の分子複雑系の分析に多くの利点を有し、複雑な混合物のシグナルに注釈を付けるため、代謝物のデータベースや同定ツールが開発されている[1]。我々は、HSQC と 2D *J* ピークのための代謝物同定ツール SpinAssign[2]と SpinCouple[3]を報告した。本研究では、これらを統合し、標品の高磁場 NMR スペクトルと PubChem ID や原子情報などを関連付けた SpinLIMS データベースを構築し、新たに MeOD 溶媒でのデータを追加した。さらに、これら 2 種相関シグナルに基づくベン図タイプの代謝物同定ツール InterAnalysis を開発した。最近の低磁場 NMR 装置の進歩は、農林水産業等の現場での混合物分析による品質管理の可能性を高めている。弱い感度を克服するため、SENSI 法[4]による S/N 比改善を報告した。また、低いスペクトル分解能に対しては、MCR-ALS や NMF 等の多変量アルゴリズムの援用を提案した[5]。本研究では、NNSC[6]を追加して PKSP（MCR-ALS、NMF、FastICA を含む）を開発し、統合ウェブツール InterSpin（http://dmar.riken.jp/interspin/）を公開した。例として、InterAnalysis でのマハゼ筋肉抽出物の代謝物同定と卓上 NMR での食品混合物分析を行った。また、SpinLIMS の拡張を可能とするデータ登録用ソフトウェアも開発した。

【方法】InterAnalysis は 700 MHz NMR のマハゼ筋肉抽出物の HSQC と 2D *J* ピークを用い、SENSI と PKSP は 60 MHz NMR の 40 種の魚肉混合物と 22 種の標品[7]の ^{1}H-NMR データを用いて実証した。

【結果と考察】マハゼ筋肉 MeOD 抽出物の場合、従来の SpinAssign と SpinCouple で各 99、110 ピークから各 223、107 の代謝物が同定されたのに対し、InterAnalysis では 25 代謝物まで絞り込むことができた。SENSI により 60 MHz NMR スペクトルは S/N 比が 2.8 倍向上した。PKSP の 4 種のアルゴリズムで分離されたコンポーネントと SENSI で強化されたピークの CV 値を用いて代謝物同定を行った結果、魚肉抽出物のピークに対し 22 種の代謝物帰属を達成した。今後は更なる代謝物同定能の向上を目指し、機械学習による化合物内の官能基カップリングの相関シグナルを重要度付けし、従来は TOCSY 等の別のスペクトル相関が必要だった帰属ステップを簡略化する試みについても述べる。

Ref. [1] Kikuchi,J. and Yamada,S. (2017) *Analyst*, 142(22), 4161-4172, [2] Chikayama,E., et al. (2010) *Anal. Chem.*, 82(5), 1653-1658, [3] Kikuchi,J. et al. (2016) *Anal. Chem.*, 88(1), 659-665, [4] Misawa,T. et al. (2016) *Anal. Chem.* 88(12), 6130-6134, [5] Wei,F. et al. (2015) *Anal. Chem.* 87(5), 2819-2826, [6] Toumi,I. et al. (2013) *Anal. Chem.*, 85(23), 11344-11351, [7] Chikayama,E., et al. (2016) *Metabolites*, 6(4), 36.

Webtool, Machine learning, Correlated signal

発表責任者：山田隼嗣（shunji.yamada@riken.jp）

講演番号：2A21p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A21 会場

マイクロ流路を利用したハイスループット GPCR リガンドアッセイ系の開発

Development of High-throughput GPCR Ligand Assay System using Microfluidics

○柳沼 謙志[1]、三浦 夏子[1,2]、青木 航[1,2,3]、小川 雅人[4]、西川 洋平[4]、細川 正人[3,5]、竹山 春子[4,5]、植田 充美[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]JST-CREST、[3]JST-さきがけ、[4]早大院先進理工、[5]早大ナノライフ創研)

○ Kenshi YAGINUMA[1], Natsuko MIURA[1,2], Wataru AOKI[1,2,3], Masato OGAWA[4], Yohei NISHIKAWA[4], Masahito HOSOKAWA[3,5], Haruko TAKEYAMA[4,5], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Dept. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JST-CREST, [3]JST-PREST, [4]Grad. Sch. Biomol. Eng., Waseda Univ., [5]Org. Nano and Life Innov., Waseda Univ.)

【背景と目的】

GPCR はシグナル伝達を媒介する膜タンパク質の 1 つである。この GPCR は内分泌や代謝など様々な生理活性に関わり、生体内で重要な役割を果たしていることが分かっている。そのため現在市販の薬の 30%が GPCR を対象にしている。しかし、GPCR のリガンドの探索は非常に難しく、現在もヒトの GPCR のうち 100 種類以上でリガンドが未知の状態である。本研究では、ドロップレットマイクロ流路を用いて GPCR のリガンドをハイスループットに探索する方法の確立を目指す。これにより、癌などをはじめとする GPCR が関わる疾病について、その発見と病的プロセスの解明や治療法の開発に大きく貢献できると考えられる。

【方法と結果】

まず、当研究室で既に構築された「Functional assay system」[1]を改良し、代表的な GPCR の一つである GLP1R の活性を培養細胞の発する蛍光に置き換えるシステムを構築した。さらに、ドロップレットマイクロ流路を用いてハイスループットアッセイ系の開発を行った。具体的には、一つのドロップレット内に GLP1R のリガンドを分泌する酵母とレポーター培養細胞を同時に封入し、ドロップレット内で一時的に共培養を行うことで、レポーター培養細胞の活性測定を行った。次に、この系を活用することで、巨大ライブラリを短時間でハイスループットに解析できると考え、GPCR リガンドライブラリの網羅的なスクリーニングを試みた。具体的な実例として、ランダム配列を持ったペプチドリガンドを酵母に分泌させることで、GLP1R リガンドの巨大ライブラリを調製し、評価を試みた。以上の結果をまとめて報告する。[2]

[1]Shigemori *et.al.* J. Biotechnol., 209.96-101.2015
[2]Yaginuma *et.al.* submitted

GPCR, high throughput, droplet microfluidics

講演番号：2A21p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A21 会場

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる新規アルカリホスファターゼ測定法の開発
A novel assay method alkaline phosphatase using signal accumulation type of ion-sensitive field-effect tansistor
○佐々本 康平、西矢 芳昭（摂南大理工）
○KOHEI SASAMOTO, YOSHIAKI NISHIYA (Setsunan Univ.)

【背景および目的】
イオン感応型電界効果トランジスタ（ISFET）は化学反応で生じるプロトンの増減を直接電気信号として取り出すことができるため、幅広い種類の酵素反応の計測に応用できるバイオセンサとなり得る。ISFET の応用については長期にわたり数多くの研究がなされたが、pH センサとして実用化されている以外には際立った応用例は見当たらない。バイオセンサとして応用するには ISFET の感度が十分でなく、信号レベルが低くてノイズに埋もれてしまうため、微少な変化に対応できないとされてきたからである。
この点を改良するために、われわれは信号累積型 ISFET バイオセンサ（SA-ISFET）を開発した。これは、電荷がセンサ内に蓄積できるように改良されており、測定を瞬時に複数回繰り返しデバイス内に信号を累積させ、増幅した後に信号を取り出す。これにより S/N 比が向上し、微少変化の検出を要求される高感度バイオセンサとしての応用が可能になった。
SA-ISFET はメディエーター等の仲介物質、あるいは光学検出法に要求される発色反応や蛍光標識を用いないので、測定対象が広範囲であり、前処理が簡単なものとなり簡便に測定できる。また、光路長を必要とする光学測定系を使用しないので装置の小型化に向いており、かつ大型機器に比べコストが低く、測定に高い技術力を必要としないといった数多くの特長を有している。
今回、SA-ISFET を医療や食品検査分野などでの免疫測定に応用することを目的として、抗体の標識酵素として多用されている、アルカリホスファターゼの活性測定を検討したので報告する。
【方法および結果】
アルカリホスファターゼ反応で微少プロトン量の変化を伴う系として、ピロリン酸を緩衝液及び基質として用いる測定系を考案した。本測定法のピロリン酸をはじめとする試薬組成および測定条件を設定し、SA-ISFET にて信号累積回数 10 回での測定を実施した。
結果として、アルカリホスファターゼ反応によって生じるプロトン量の変化を計測することができた。37℃で 5 分間のアッセイが可能であり、直線性も良好であった。また、再現性においてもバイオセンサとして問題ないレベルであった。
【結論】
本測定系にて、アルカリホスファターゼ測定用バイオセンサを構築することが可能である。今後、免疫検査における標識酵素検出法に応用したい。

ISFET, alkaline phosphatase, biosensor

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2A21p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A21 会場

局所麻酔薬プロカインによるグラミシジン A チャネルを介したイオン透過の阻害機構
Inhibition mechanism of a local anesthetic procaine on the ion transport across gramicidin A channels
山口 拓也、○白井 理、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
Takuya YAMAGUCHI, ○Osamu SHIRAI, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

生体における神経伝導にはイオンチャネルの働きが深く関与している。活動電位の発現・伝播および静止電位の維持は、神経細胞膜中に発現している Na^+ チャネルと K^+ チャネルの働きによって理解されている。麻酔薬はこれらのチャネルの機能を阻害することで、神経細胞を麻痺させて痛覚を緩和すると考えられている。麻酔薬は投与方法により吸入麻酔薬と局所麻酔薬の 2 種類に分類される。吸入麻酔薬は、呼吸器から吸入される揮発性の分子であり、主に中枢神経の神経伝導を抑制するとされている。一般的には、吸入麻酔薬は脂質膜に分配し、膜の流動特性を変化させる、あるいはチャネルに直接作用して機能を阻害すると考えられている。しかし、我々の研究グループは吸入麻酔薬を平面脂質二分子膜 (planer bilayer lipid membrane; pBLM) 系に添加した実験を行い、直接 pBLM を介した親水性イオンの透過が促進されることを報告した。これは、不導体であった脂質層部分に吸入麻酔薬が濃縮されることで膜内の誘電率が上昇し、脂質層にイオンが溶解しやすくなるため、系に親水性イオン (K^+、Na^+、Cl^- など) しか存在しない場合でもイオン透過が促進されたためと結論付けた。したがって、吸入麻酔薬の作用機序は神経細胞の脂質膜部分での漏電による膜電位変化伝播 (神経伝導) の阻害が原因であると提案した。一方、局所麻酔薬は痛感部位付近に注入され、末梢神経から中枢神経への神経伝導を抑制することで部分的に痛覚を遮断するとされている。例えば、三級アミンである局所麻酔薬は生体内で酸解離平衡にあるが、疎水性の高い局所麻酔薬の中性型が BLM を透過し、細胞内側で再びカチオン型となり、電位依存性 Na^+ チャネルと内側から特異的に結合して不活性化させると説明されている。しかしながら、局所麻酔薬との結合部位は明確ではなく、この説は未だ実証されていないのが現状である。

本研究では、チャネル形成剤の中でも最も構造が単純なものとして知られている gramicidin A (gA) を系に添加し、pBLM 上に gA チャネルを発現させて、各膜電位における単一チャネル電流を測定することでチャネルの機能変化を調べることにした。典型的な局所麻酔薬の一種であるプロカインを pBLM を介した片側および両側の水相に添加し、阻害作用の方向性やプロカイン濃度との関係性を調べた。得られた結果より、局所麻酔薬の作用機序は以下のように考えている。1) 細胞外に局所麻酔薬が高濃度となるように添加され、2) 嵩高い疎水性の局所麻酔薬カチオンはチャネル孔を介して内部へ移動しようとするが、チャネル孔より大きいために透過できない。しかし、3) Na^+ の外側から内側への輸送と競争反応となるため、外側の Na^+ の相対的な活量が低下し、Na^+ の流入を阻害する。

Local anesthetics, Ion transport, Gramicidin A channel

発表責任者：白井　理（shiraio@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A21p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A21 会場

神経軸索を模擬した液膜型セル系を用いた電位固定法についての検討
Study on the voltage-clamp method using liquid membrane cell system mimicking the nerve axom
○加地 麻衣子、白井 理、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Maiko Kaji, Osamu Shirai, Yuuki Kitazumi, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】
神経細胞における活動電位は，K^+ チャネル及び Na^+ チャネルの働きによる局所的な膜電位変化が軸索上を伝わることで発現する．平常時，膜電位は細胞内外の K^+ 濃度比によって決定されており，静止電位と呼ばれている．外部刺激を受けるとシナプス上で受容体型 Na^+ チャネルが開き，細胞内外の Na^+ 濃度比に起因する活動電位が発生する．活動電位が軸索まで伝わると軸索上の電位依存性 Na^+ チャネルが開くため，膜電位変化が軸索上を伝播していくと考えられている．軸索における活動電位の伝播挙動については，一般的に電位固定法と呼ばれる手法を用いて検討されてきた．本研究では，それぞれのチャネルの機能を再現した液膜型セルを複数個設置した神経モデル系を構築し，活動電位が発生した際の各セルの電気的挙動を調べた．全体の膜電位を固定し，局所的に膜電位が変化した際に生じる液抵抗による電位降下と膜電位変化の伝播の関係について検討した．また，電位固定法を用いない場合のモデル神経系における膜電位変化の伝播挙動と比較し，電位固定法の妥当性を議論した．
【方法】
ニトロベンゼンを含浸させた PTFE 製多孔質膜を用いて，水相（W1）｜膜相（M）｜水相（W2）からなる有機液膜型ガラスセルを準備した．各セルにおいて W1 を細胞外液，W2 を細胞内液，M を細胞膜と見立てて並列に接続した．K^+ チャネル及び Na^+ チャネルの特性を反映させる目的で各層のイオン組成を調整した．それらのセルを並列に設置し，膜電位を固定して，電位固定法における軸索部分における膜電位変化挙動の測定系に相当する回路を作製した．このとき，膜電位固定用の電極と細胞膜間の液抵抗を考慮して，抵抗を設置した．全体の膜電位を固定した状態で外部から電圧を印加し，その際の各セルの膜電位と電流の変化を記録した．また，電位を固定しない系でスイッチを切り替えることで受容体型 Na^+ チャネルの開閉を行い，膜電位を固定した場合と比較した．
【結果と考察】
電位固定モデルにおいて，発信部位を活動電位に切り替えると，回路上に環電流が発生し，各セルにおいて膜電位変化が観察された．このとき，全体の膜電位固定用の電極にも電流が流れた．この電流の大きさは電極・膜間の抵抗に依存し，電流値が大きいほど活動電位の伝播が促進された．また，電位を固定しないモデルと比較することにより，従来の電位固定法では活動電位の伝播が促進されることが判明し，電位固定法による解析には問題があることが判った．

nerve propagation, voltage-clamp method, liquid membrane

講演番号：2A21p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A21 会場

メタノールセンサー酵母細胞を用いたペクチンメチルエステラーゼ活性の可視化と評価

Visualization and evaluation of pectin methylesterase activity using yeast cell-based methanol sensor

○竹谷 友之、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Tomoyuki TAKEYA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールにより特異的かつ強力に誘導される遺伝子プロモーターを持ち、その誘導の強さはメタノール濃度に依存する。我々はこれまでに、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* のメタノール誘導性遺伝子のひとつであるジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子（*DAS2*）のプロモーター支配下に蛍光タンパク質 Venus-PTS1（PTS1; ペルオキシソーム局在化シグナル配列）を発現させることにより、培地中のメタノール濃度に応じた強さの蛍光を発する『メタノールセンサー細胞』を開発し、前回大会で報告した [1]。一方、メタノール生成活性をもつ酵素には産業上有用なものがある。本センサー細胞にそうした酵素遺伝子を発現させることにより、生成したメタノールを検出し、高活性酵素のスクリーニングなどの機能開発に利用できるのではないかと考えた。本研究では、メタノール生成酵素として植物バイオマスからのメタノール生産に利用可能なペクチンメチルエステラーゼ（PME）[2]を例に、ペクチンからメタノールを生成する PME 活性の本センサー細胞による可視化を目的に研究を行った。

【方法・結果】*P. pastoris* を用いて開発したメタノールセンサー細胞に、クロコウジカビ *Aspergillus niger* 由来 PME を *GAP* プロモーター支配下に導入し、シングルコピーおよびマルチコピー導入株を取得した。これらの株をグルコースを炭素源として培養し、培養上清中に分泌生産された PME 量、および培溶液体積あたりの PME 活性を評価したところ、PME 発現株では PME の量・活性がその導入コピー数に比例して増大していた。一方、PME 非発現株では PME 活性が検出されなかった。次に、このように PME 発現量の異なる菌体をそれぞれ、ペクチンを単一炭素源として含む培地に移し、4 時間後にフローサイトメトリーで細胞の蛍光強度を調べたところ、PME の導入コピー数に比例して細胞の蛍光強度の増大が見られた。また、PME 発現株においては、細胞の蛍光強度が菌体濃度にも比例して増大した。これらのことから、培溶液中に分泌された PME の活性の強弱を、本センサー細胞を用いて可視化できることがわかった。

1) 竹谷ら、日本農芸化学会 2017 年度大会、3C17p12
2) Kawaguchi et al. (2014) Biosci Biotechnol Biochem 78:718-721

Pichia pastoris, Pectin methylesterase, Methanol-inducible gene expression

講演番号：2A21p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A21 会場

ボトムアップジェネティクスの実現に向けた *in vitro* 転写翻訳システムの改良

Improving *in vitro* transcription/translation system toward establishment of bottom-up genetics

○青木 航、古村 崚、植田 充美（京大院・農・応用生命）
○Wataru Aoki, Ryo Komura, Mitsuyoshi Ueda (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】

生物学的システムの理解を目指して、従来の生命科学研究では、トップダウン型とボトムアップ型の二つの方法論が用いられてきた。トップダウン型の方法論では、遺伝学的手法などを用いて生物学的システムを構成する因子の同定が試みられる。一方、ボトムアップ型の方法論では、同定された因子を組み合わせることで生物学的システムの *in vitro* 再構成が試みられる。これまでの生命科学においては、これら二つの方法論を交互に適用することでさまざまな知見が蓄積されてきたが、複雑な生物学的システムを理解するためには膨大な時間と労力を要するという問題があった。

そこで、本研究では、生命科学研究の加速を目指して、まったく新しい方法論である「ボトムアップジェネティクス」を提唱してきた【1】。ボトムアップジェネティクスは、従来のトップダウン型とボトムアップ型の方法論の強みを併せ持つ。そのため本方法論は、研究対象となる生物学的システムが機能するための必要十分条件を一度の実験で決定することができる。

【内容】

ボトムアップジェネティクスの最も重要な要素は、リポソーム内部に再構成型転写翻訳システムを導入した人工細胞を調製することである。この人工細胞は、さまざまな生物学的システムを再構成するための白紙の細胞と見なすことができる。例えば、何らかの生物学的システムの機能の指標となるレポーターを作成し、それと共に、全遺伝子ライブラリから遺伝子を“ランダム”に人工細胞に封入する。封入された遺伝子は RNA 合成酵素とリボソームによって発現し、機能を発揮する。レポーターが反応すれば、その人工細胞内部には対象の生物学的システムの機能に必要十分な遺伝子セットが存在すると想定される。本発表では、ボトムアップジェネティクスの実現に向けて、*in vitro* 転写翻訳システムの改良を試みた実験の結果をまとめて報告する【2】。

【1】Aoki et al., Sci. Rep., 4722, 2014
【2】Komura et al., submitted.

bottom-up genetics, artificial cell, *in vitro* transcription/translation

発表責任者：青木　航（aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A21p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A21 会場

全自動 1 細胞解析単離装置によるヒト血液からのモノクローナル抗体の迅速樹立

Efficient Establishment of Monoclonal Antibodies from Human Blood Cells by Automated Single-cell Analysis and Isolation System

○小林 佑輔[1]、立松 健司[1]、山﨑 智子[1]、高井 みな実[1]、田中 勇悦[2]、黒田 俊一[1]([1]阪大・産研、[2]琉大・医)
○Yusuke KOBAYASHI[1], Kenji TATEMATSU[1], Tomoko YAMAZAKI[1], Minami TAKAI[1], Yuetu TANAKA[2], Syun'ichi KURODA[1] ([1]ISIR, Osaka Univ., [2]Ryukyu Univ.)

【背景】体内に侵入したウイルスや病原体を効果的に排除するには、液性免疫の要である抗体が重要な役割を担っている。近年、エボラ出血熱、ジカ熱、SARS、MARS等の重篤かつ治療困難な感染症が多数報告されており、これらの感染拡大を防ぎかつ感染者体内から速やかにウイルスや病原体を排除するためには、迅速に中和抗体を作成し、医薬品化することが極めて重要である。しかし、現在の一般的な抗体生産技術では、実験動物にウイルスや病原体を接種し、惹起した抗体を単離した後、中和活性を確認し、さらに免疫原性を低減させるためヒト型抗体に改造する必要があった。
【目的】本研究では、ウイルスや病原体による感染から自然治癒した患者が一人でも発見できた場合、その末梢血に含まれる抗体産生細胞をライブラリー化し、膨大な抗体産生細胞群の中から、ウイルスや病原体の中和抗体を惹起すると予想される抗原に応答する抗体産生細胞を 1 細胞単離し、迅速に抗体遺伝子を単離する方法を確立することを目指している。本方法が完成すれば、完全ヒト型モノクローナル抗体の迅速樹立法となり、今後の抗体医薬開発における最重要技術になると考えている。
【方法】成人T細胞白血病（ATL）の原因ウイルスであるHTLV-1をモデル感染症として、同ウイルス感染者血液由来B細胞にEpstein-Bar virus(EBV)を感染させて不死化し、抗体産生細胞ライブラリーを作製した。次に、HTLV-1エンベロープタンパク質gp46に対する抗体の分泌細胞を、細胞表層蛍光抗体アッセイ法（CS-FIA法）[1]により抗体分泌量依存的に標識し、「数十万規模のセルアレイから蛍光輝度情報に基づき目的細胞を 1 細胞単位で認識し、非侵襲的に全自動 1 細胞単離できるロボット（古河電工・アズワン製）」[2]により蛍光輝度上位5細胞を単離回収した。直ちに 1 細胞cDNA合成を行った後、抗体N末端側の可変領域をコードする遺伝子を5’RACE法により増幅した。
【結果】特定ATL患者の抗体産生細胞ライブラリーから単離された抗gp46抗体分泌細胞2種類から同じ塩基配列のIgG重鎖遺伝子がそれぞれ得られた。今回得られた抗体遺伝子については、培養細胞で発現し、精製を行った後、HTLV-1中和抗体としての性能を検討する予定である。
【考察】全自動 1 細胞解析単離ロボット、CS-FIA法及び1細胞遺伝子クローニング技術を組み合わせれば、従来の実験動物由来モノクローナル抗体作成に要する手間と期間を大幅に削減するのみならず、ヒトを含めた広範囲な動物種のモノクローナル抗体の迅速作成を可能にすることが示唆された。

[1] Kida A, et al *Analytical Chemistry* 85 (2013) 1753-1759.
[2] Yoshimoto N, et al *Scientific Reports* 3 (2013) 1191.

single-cell, HTLV-1, monoclonal antibody

発表責任者：黒田俊一（skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A22a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A22 会場

活性型および不活性型組換えヒトチロシナーゼの発現

Expression of active and inactive recombinant human tyrosinases

○太田 珠里亜[1]、本澤 友里[1]、中村 友也[1]、阿波賀 希絵[2]、渋川 弘貴[1]、横山 佳大[2]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2] ([1]名城大院農、[2]名城大農)
○Julia OTA[1], Yuuri HONZAWA[1], Tomonari NAKAMURA[1], Kie AWAGA[2], Koki SHIBUKAWA[1], Keidai YOKOYAMA[2], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Agric., Meijo Univ.)

メラニンは皮膚や毛髪の色を決定する色素であり、紫外線を吸収し、紫外線による細胞のダメージを防ぐ役割を担っている。皮膚組織が紫外線 B 波に暴露されると、ケラチノサイトから活性化因子が放出され、メラニン色素の合成・貯蔵を行うメラノソームがメラノサイト中に形成される。メラノサイトは樹状突起を介し、形成したメラノソームを周囲のケラチノサイトに輸送し、メラニンが肌表面に現れる。メラニンの合成は、血中から供給された L-チロシンを基質として、数種のメラニン合成酵素の関与の下で行われる。このとき、L-チロシンから L-DOPA への酸化を触媒する酵素としてチロシナーゼ（TYR)、ドーパクロムから 5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸（DHICA）への酸化を触媒する酵素としてチロシナーゼ関連タンパク質 2（TRP2)、DHICA からインドール-5,6-キノン-2-カルボン酸への酸化を触媒する酵素としてチロシナーゼ関連タンパク質 1（TRP1）が関わっている。特に TYR はメラニン生合成経路における律速酵素であることから、本反応を阻害することでメラニン合成を阻害できると考えられている。近年、しみ・そばかすに対する美白化粧品や白斑症治療薬の開発が進められているが、それらの研究において、現在、主に用いられている TYR はマッシュルーム由来であり、ヒトの TYR（hTYR）とは酵素学的な性質が異なることが問題となっている。また、hTYR の組換えタンパク質には、ヒト培養細胞由来の hTYR や大腸菌発現系で調製した hTYR などがあるが、高活性な hTYR の組換えタンパク質を大量に調製することは難しい。これらが美白化粧品や白斑症治療薬の開発が進まない一因となっている。そこで本研究では、真核細胞発現系であるカイコ-バキュロウイルス発現系を用い、翻訳後修飾がなされ、天然型の hTYR に類似した構造と性質を有する高品質の可溶性組換え hTYR を大量調製することを目的とした。

タグの種類や位置がカイコ-バキュロウイルス発現系における組換え hTYR の調製にどのような影響を与えるのかを調べるために hTYR のエクトドメインの N 末端側に His タグを有する組換え hTYR、N 末端側あるいは C 末端側に FLAG タグと His タグを有する組換え hTYR、N 末端側に His タグと GST タグを有する組換え hTYR を調製し、活性測定を行った。その結果、タグが酵素活性や溶解性に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

また、組換え hTRP1 および組換え hTRP2 の作製に関する研究を行ったので結果を報告する。

human tyrosinase, recombinant protein, baculovirus-silkworm expression system

発表責任者：太田珠里亜（juliaota0518@gmail.com）

講演番号：2A22a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A22 会場

カイコ-バキュロウイルス発現系を用いた活性型組換えヒトチロシナーゼの発現

Functional expression of recombinant human tyrosinase using baculovirus-silkworm expression system

○横山 佳大[1]、中村 友也[2]、本澤 友里[2]、太田 珠里亜[2]、小池 正太[2]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2]（[1]名城大農、[2]名城大院農）
○Keidai YOKOYAMA[1], Tomonari NAKAMURA[2], Yuuri HONZAWA[2], Julia OTA[2], Shota KOIKE[2], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Fac. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

＜背景と目的＞チロシナーゼ（TYR）は銅含有ポリフェノールオキシダーゼの一種であり、メラニン生合成における律速酵素である。ヒトチロシナーゼ（hTYR）は、I 型膜タンパク質であることが知られており、エクトドメイン（メラノソーム内ドメイン）に活性部位が存在する。hTYR 反応を阻害することでメラニン合成を抑制できるので、hTYR 阻害剤の探索は美白化粧品の開発につながると考えられる。現在、研究に使用されている組換え hTYR には大腸菌やヒト培養細胞で発現させた組換えタンパク質が多いが、翻訳後修飾、フォールディング、収量、費用などの点で問題があるとされる。そこで本研究では、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて、高活性の可溶性組換え hTYR の大量発現系を確立することを目的とした。
＜方法と結果＞hTYR の全長（FL）あるいはエクトドメイン（ED）の N 末端側に His タグを融合させた組換えタンパク質をカイコ-バキュロウイルス発現系により発現させ、アフィニティー精製を行った（His-hTYR/FL あるいは His-hTYR/ED）。His-hTYR/FL はカイコ幼虫の体液に分泌されなかったが、これは膜貫通ドメインが存在するためであると考えられた。His-hTYR/ED はカイコ幼虫体液に分泌され、可溶性タンパク質として精製された。L-DOPA を基質として精製 His-hTYR/ED の活性測定を行い、最適 pH、最適温度、温度安定性、金属イオン要求性、阻害剤の影響、K_m 値の測定などの酵素学的性質の解析を行ったところ、過去の研究において解析された hTYR の性質に匹敵する結果が得られた。また、ネガティブコントロールとして用いた非組換えウイルス感染カイコ幼虫体液由来のサンプルでは TYR 活性はまったく確認されなかった。
＜結論＞以上の結果から、真核細胞発現系であるカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて、高活性の可溶性組換え hTYR を大量生産する発現系を確立することができたと考えられ、新規 hTYR 阻害剤のスクリーニングなどに応用できる可能性が示唆された。

human tyrosinase, melanin, baculovirus-silkworm expression system

発表責任者：横山佳大（140562118@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：2A22a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A22 会場

ヒトフィラグリンとヒトケラチンの相互作用
Interaction of human filaggrin with human keratins

○本澤 友里[1]、永田 理奈[2]、佐々木 久実[2]、高橋 美緒[2]、長谷川 瑛美[2]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2]
([1]名城大院農、[2]名城大農)
○Yuuri HONZAWA[1], Rina NAGATA[2], Kumi SASAKI[2], Mio TAKAHASHI[2], Emi HASEGAWA[2], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Agric., Meijo Univ.)

皮膚は、水分保持機能や外部からの異物の侵入を防止するバリア機能をもっている。健康な皮膚であれば異物は表皮から侵入できないが、皮膚のバリア機能が破綻すると異物が侵入しアレルゲンとして機能する場合がある。その結果、アトピー性皮膚炎が発症することがあり、その対処法としてステロイド剤や抗ヒスタミン剤などの治療薬が使用されているが、本質的な治療法ではないために皮膚バリア機能が破綻した皮膚では再発しやすいことが問題となっている。したがってアトピー性皮膚炎の新規治療法を開発するためには皮膚バリア機能に関与する分子の相互作用のメカニズムを理解する必要があると考えられている。皮膚のバリア機能に関連する分子としてフィラグリン（FLG）とケラチンが挙げられる。ヒトの FLG は、表皮の顆粒層のケラトヒアリン顆粒でプロフィラグリン（proFLG）として合成される。proFLG は FLG 単位が 10 個から 12 個連なった構造をしており、角質層へ移行する際に脱リン酸およびリンカープロセシングを受けて FLG モノマーとなる。表皮の顆粒層において発現しているケラチンはケラチン 1（K1）とケラチン 10（K10）であり、head ドメイン、rod ドメイン、tail ドメインで構成されている。FLG モノマーはケラチンフィラメントを凝集してケラチンパターンを形成することで、皮膚の強固な構造を支持している。その後、FLG モノマーはさらに脱イミノ化とプロセシングを受けることで天然保湿因子となり、皮膚における水分保持を担っている。しかしながら、FLG と K1、K10 の詳細な相互作用の分子メカニズムは明らかになっていない。そこで、ヒト皮膚における FLG と K1、K10 の相互作用を解明するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて FLG と K1、K10 の相互作用解析を行った。

ヒト FLG モノマー、ヒト K1 の head ドメイン、ヒト K10 の head ドメインの cDNA クローニングを行い、FLG モノマーを bait、K1 あるいは K10 の head ドメインを prey として相互作用を解析したところ、FLG モノマーは K1 や K10 の head ドメインとは相互作用しないことが明らかとなった。

以上の結果から、ヒト皮膚において FLG モノマーは K1 や K10 の rod ドメインあるいは tail ドメインと相互作用して皮膚の強固な構造を形成していることが示唆された。

human filaggrin, human keratin, yeast two-hybrid system

発表責任者：本澤友里（173561020@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：2A22a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A22 会場

食品タンパク質酵素加水分解物中に含まれるカチオン性抗菌ペプチドの創傷治癒活性とその作用機構

Wound healing activity and mechanism of action of antimicrobial cationic peptides from enzymatic hydrolysate of food proteins

○谷口 正之、斉藤 寿槻、生江 俊樹、落合 秋人、田中 孝明（新潟大自然研）
○Masayuki Taniguchi, Kazuki Sato, Toshiki Namae, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka (Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】当研究室では，これまでにコメやダイズのタンパク質の部分配列から抗菌ペプチドを見出しており，これらの抗菌ペプチドが，抗炎症や創傷治癒などの生理活性を兼ね備えていることを報告している[1-4]。また，コメ糠タンパク質のペプシン加水分解液中に含まれるカチオン性ペプチド画分が，ヒト病原微生物に対して抗菌活性を発揮すること，さらに活性画分から同定した 3 種類のペプチドが抗菌活性と内毒素中和活性を兼ね備えていることを明らかにした[5]。そこで本研究では，同定した 3 種類のカチオン性ペプチドの創傷治癒作用を，血管新生促進活性と細胞遊走促進活性を測定することによって評価した。また，カチオン性ペプチドの創傷治癒の作用機構について検討した。

【実験方法】本研究では，次のようにして，ペプチドの血管新生促進活性を評価した。予め 96 ウェルプレートに Matrigel（Becton Dickinson and Company）を添加し，人工基底膜を作製し，その上にヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC：クラボウ）と各ペプチドを添加した。一定時間培養した後に，顕微鏡で管腔（血管）構造を形成した細胞を観察し，その細胞の長さの合計を測定し，その値から本活性を評価した。また，スクラッチ法を用いてペプチドの細胞遊走促進活性を測定した。最初に，24 ウェルプレートに HUVEC を播種し，コンフルエントな状態まで培養した後，スクラッチスティック（IWAKI）によって一定の幅で細胞をはぎ取り，傷を作製した。その直後に各ペプチドを添加して，24 時間毎に傷の閉鎖状態を面積として測定し，細胞遊走促進活性を求めた。

【結果】血管新生促進試験において，３種類のペプチド（SSF，LRR，および EKL）をそれぞれ添加した場合に，ポジティブコントロールとして用いたヒトペプチド LL-37 と同じように，血管構造をした細胞がより密な状態となり，その細胞の長さの合計が，無添加の場合に比べて増加した。また，細胞遊走促進試験においても，LL-37 と同じように，SSF，LRR，および EKL をそれぞれ添加した場合に，程度の差はあったが，創傷閉鎖が促進された。今後，各種阻害剤を用いて作用機構を検討する予定である。

1) M.Taniguchi *et al.*: ***Peptide Science,*** Vol.104, p.73-83 (2015).
2) M. Taniguchi *et al.*: ***Peptides,*** Vol.75, p.101-108 (2016).
3) M. Taniguchi *et al.*: ***Biosci. Biotechnol. Biochem*.,** Vol.81, No.4, p.634-650 (2017).
4) M. Taniguchi *et al.*: ***Peptide Science***, Vol.108, No.4, e23023 (11 pages) (2017).
5) M. Taniguchi *et al.*: ***J. Functional Foods***, Vol.34, p.287-296 (2017).

cationic peptide, wound healing peptide, multifunctional peptide

発表責任者：谷口　正之（mtanig@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A22a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A22 会場

黄色ブドウ球菌二成分性毒素γ-ヘモリジンのβバレル型膜孔形成機構の解明

Molecular mechanism of β-barrel assembly of Staphylococcal bi-component toxin

○武田 慶胤[1]、田中 良和[2]、金子 淳[1]([1]東北大院農、[2]東北大院生命)
○ Kein TAKEDA[1], Yoshikazu TANAKA[2], Jun KANEKO[1] ([1]Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Tohoku Univ.)

【背景・目的】

黄色ブドウ球菌が産生する二成分性毒素γ-ヘモリジン(γ-HL)は、赤血球膜に LukF、Hlg2 の二成分が順次結合し、膜孔中間体を経てβバレル型膜孔を形成する。βバレルを形成する stem domain は、可溶性モノマー内では pre-stem として折り畳まれており、オリゴマー化に伴い伸長する。我々は、一成分性のβバレル型膜孔形成毒素α-ヘモリジン(α-HL)において、pre-stem は、その内部の Y118 と cap domain の D45 間の水素結合によって折り畳まれた状態で保持され、膜孔形成時の D45-Y118 切断には隣接モノマーの N-末端 Amino-latch が関与し、それが stem 伸長開始のスイッチとなることを結晶構造と生化学的解析から見出した(文献 1)。一方、γ-HL の膜孔の立体構造から、当該 D-Y 各残基は各成分で保存されているが、LukF の Amino-latch に相当する N-末端 17 残基の欠失は溶血活性に影響せず(文献 2)、α-HL とは pre-stem 伸長のスイッチ機構が異なると予測された(文献 3)。そこで、γ-HL の stem 伸長のスイッチとなる残基の特定を試みた。

【方法・結果】

γ-HL 膜孔の立体構造から、pre-stem の D-Y 間の水素結合が、膜孔形成時には隣接成分の塩基性残基 X との D-X のイオン結合に置換すると推定した。X の候補残基として Hlg2 の K15 と R16, LukF の K21 を選出し、これらの Ala 置換変異体を取得して、溶血活性および膜結合性への影響を評価した。Quick Change 法で発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3)株に導入して変異毒素タンパク質を取得した。これらを LukF または Hlg2 と共に 37ºC、10 分間ヒト赤血球に作用させ、溶血活性と Western blotting による毒素の膜結合性を解析した結果、Hlg2 の K15A, R16A 変異体は赤血球への結合能は保持しているものの溶血活性を失ったことから、これらの残基がγ-HL における stem 伸長のスイッチとして機能している可能性が示唆された。一方、LukF K21A 変異は溶血活性には影響しなかった。現在、これらの変異による stem 伸長への影響についてより詳細な解析を行っている。

1） Sugawara et al., Toxicon 180, 226-231, (2015)
2） Kaneko et al., BBB 62(2):1465-1467, (1998)
3） Yamashita et al., PNAS 108(42):17314-17319 (2011)

β-barrel pore-forming toxin, *Staphylococcus aureus*, molecular mechanism

発表責任者：武田慶胤（kein.takeda.t3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A22a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A22 会場

溶血性レクチン CEL-III のドメイン 3 変異体を用いた多量体化機構の解明

Elucidation of the oligomerization mechanism of hemolytic lectin CEL-III domain 3 mutants

○郷田 秀一郎、山脇 佑太、海野 英昭、畠山 智充（長崎大工）
○Shuichiro GODA, Yuta YAMAWAKI, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

ナマコの一種である海産無脊椎動物グミ（*Cucumaria echinata*）は溶血性レクチン CEL-III をもつ。溶血活性は CEL-III が細胞表面の糖鎖と結合した後に多量体化し、イオン透過性の孔（ポア）を形成することによって起こる。CEL-III 単量体の立体構造解析から、CEL-III は糖結合ドメインであるドメイン 1 及び 2 と孔形成に寄与するドメイン 3 から成ることが明らかとなっている。孔を形成した七量体の立体構造から、ドメイン 3 の二つのαヘリックスがβストランドとなり、七量体化によってできる 14 本のβストランドがβバレルを形成する。しかしながら、七量体化における構造変化、すなわち多量体化と膜孔形成の中間状態は不明である。七量体の立体構造から七量体形成時のプロトマー間の相互作用は、ドメイン 3 のβバレル形成のみならず、異なるプロトマーのドメイン 1 とドメイン 2 にもみられる。これらのことから、ドメイン 1 及び 2 は細胞表面の認識のみならず多量体化にも貢献していることが考えられた。本研究では、ドメイン 3 のβバレル形成部位（Stem 部位）を欠損した変異体を作成し、その多量体化について解析した。

Stem 部位欠損変異体は大腸菌 BL21CodonPlus(DE3)RIPL を宿主に用いて生産した。発現ベクター pET-3a/CEL-III から PCR によって Stem 部位を欠損させた。目的タンパク質は封入体として得られたため、塩酸グアニジンで可溶化し、希釈することで変性剤濃度を低下させ巻き戻しを行った。巻き戻し後の精製はゲルろ過クロマトグラフィーを行い、SDS-PAGE で単一のバンド示すまで精製に成功した。欠損変異体の構造及び大きさは X 線小角散乱(SAXS)測定によって解析した。その結果、欠損変異体のギニエ半径(*Rg*)は 91.3 Å であり、同条件下で野生型は単量体で存在し、*Rg* は 24.5 Å あることから、多量体化していることが明らかとなった。また、CEL-III は、pH10.0、糖であるラクツロース及びカルシウム存在下で溶液中でも多量体化することが知られている。そこで、pH10.0 で SAXS 測定を行うと変異体の *Rg* は 69.8 Å、さらにラクツロースを加えると 69.0 Å となった。野生型は、pH 10.0、糖存在下で 21 量体を形成し、*Rg* は 99.0 Å、21 量体に界面活性剤を加えると七量体に解離し 62.1 Å である。これらのことから、欠損変異体は pH 10.0, 糖存在下でなくても多量体化し、pH 10.0、糖の存在でより小さい分子に解離することが明らかとなった。このことから、Stem 部位欠損 CEL-III は多量体を形成し、ドメイン 1,2 が多量体化にも寄与していることが示唆された。

lectin, pore forming toxin

発表責任者：郷田秀一郎（sgoda@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：2A22a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A22 会場

D-ferredoxin-1 の化学合成

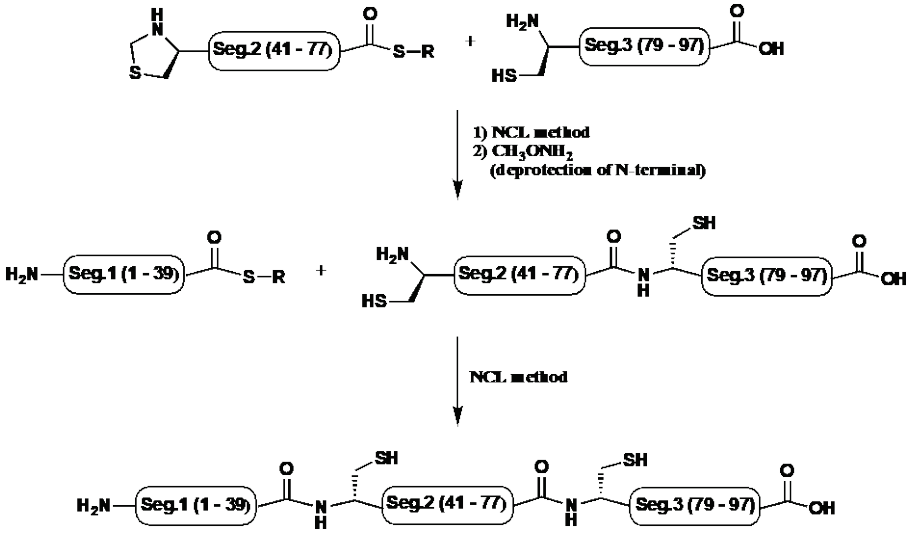
The synthetic study of D-ferredoxin-1

○石田 優介、大西 裕介、栗栖 源嗣、北條 裕信 (阪大蛋白研)
○Yusuke Ishida, Yusuke Oonishi, Genji Kurisu, Hironobu Hojo (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Ferredoxin(Fd)は鉄-硫黄クラスターをもち、生体内では、電子のキャリアーとしてはたらいている。電子の授受の際には、Fd-dependent-enzyme と呼ばれる他のタンパク質と接触し相互作用することが知られているが、その結合様式や電子伝達の機構の詳細は未だに解明されていない。

あるタンパク質を構成するアミノ酸を、全て D 体に置き換えたタンパク質(D-タンパク質)は、対応する天然のタンパク質の鏡像体である。この性質により、D-タンパク質はタンパク質どうしの相互作用の機構を解明する上で有用なツールになり得る。そこで、D-Fd と L 体の Fd-dependent-enzyme との相互作用を解析することで天然の Fd と Fd-dependent-enzyme の相互作用機構について新しい知見が得られるのではないかと考えた。しかし、D-タンパク質は生物学的手法では得ることができないため、本研究では化学合成法を用いた D-Fd の合成検討を行った。

合成経路は Scheme 1 に示した通りである。Fd を 3 つのセグメントに分け、それぞれをペプチド固相合成法により調製した。Cys 残基の N-末端側で化学選択的に 2 つのペプチドを縮合することができる Native chemical Ligation (NCL)[1] 法によりそれぞれのセグメントを縮合して Fd の全長鎖を調製した。現在、鉄硫黄クラスターの導入及びフォールディング条件の最適化を検討中である。



Scheme 1. Synthetic route of reduced form of ferredoxin-1

1) Dawson, P.E., Muir, T.W. , Clark-Lewis, I. , Kent, S.B.H. *Science,* **1994**, 266, 776-779

Ferredoxin, Chemical synthesis of protein, D-protein

講演番号：2A22a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A22 会場

ヒト SUMO2 変異体ライブラリからの PD-1 結合クローンの選択
Selection of PD-1 binders from human SUMO2 mutant libraries

○牧野 祥嗣、河上 佳奈、伊藤 伸哉（富山県大工）
○Yoshihide MAKINO, Kana KAWAKAMI, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】がん細胞は、PD-L1 蛋白質を提示して免疫細胞による細胞障害から逃れ、悪性化することがある。近年、このような免疫チェックポイントを阻害する抗体医薬が開発され、その高い抗がん活性が注目されている。抗体医薬オプジーボ（ニボルマブ）やキイトルーダ（ペムブロリズマブ）は、PD-L1 を認識する T 細胞上のレセプターPD-1 に結合してそれらの相互作用を阻害し、細胞障害を復活させる。我々は、微生物で組換え生産でき、高価な抗体医薬の代替えとなるようなタンパク質の開発を進めている。本研究では、上記抗体医薬品と同様の PD-1 と PD-L1 の相互作用の阻害能を持つような代替タンパク質の創出を見据え、まず PD-1 に親和性を持つ代替タンパク質の選択を試みた。
【方法】我々は既に、SUMO2（small ubiquitin-related modifier 2）の分子表面上 5 アミノ酸残基のランダムアミノ酸置換体を提示する、ファージディスプレーライブラリを構築し利用している。まず、PD-1 タンパク質と本ライブラリを混合し、親和性選択を行った。次に、選択されたライブラリに含まれる SUMO2 変異体遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。その後、オリジナルライブラリと比較して高頻度に見いだされたクローンの遺伝子を再構築し、組換えタンパク質の調製、親和性解析を行った。
【結果】親和性選択は、NNK コドン置換ライブラリ（Lib1）、NNB コドン置換ライブラリ（Lib2）の 2 ライブラリを用いて行った。続くシーケンス解析により、PD-1 存在下での親和性選択時に特異的に高頻度で出現する配列があることがわかった。そのような遺伝子配列を Lib1 から 7 種類、Lib2 から 6 種類選び、組換えタンパク質を調製した。ELISA による親和性解析を行ったところ、複数のクローンで HER2 への親和性を示すシグナルが認められた。

phage display, PD-1, antibody alternative

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A22a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A22 会場

抗菌ペプチド cecropin P1 (CP1)の calmodulin を用いた *E. coli* を宿主とした大量発現

Large-scale expression of anti-microbial peptide cecropin P1 (CP1) in *E. coli* using calmodulin as fusion partner

○加藤 貴純[1]、石田 博昭[2]、大沼 幸暉[1]、塚本 卓[1,3,4]、菊川 峰志[1,3,4]、出村 誠[1,3,4]、ホーゲル ハンス[2]、相沢 智康[1,3,4] ([1]北大理、[2]カルガリー大、[3]北大先端生命、[4]北大 GI-CoRE ソフトマターGS)
○ Takasumi KATO[1], Hiroaki ISHIDA[2], Koki Onuma[1], Takashi TSUKAMOTO[1,3,4], Takashi KIKUKAWA[1,3,4], Makoto DEMURA[1,3,4], Hans J. Vogel[2], Tomoyasu AIZAWA[1,3,4] ([1]Hokkaido Univ., [2]Calgary Univ., [3]Fac. Adv. Sci.Hokkaido univ., [4]GI-CoRE Hokkaido univ.)

（研究背景）

数十程度のアミノ酸残基からなるペプチドの内、細菌などに対する抗菌性を有するものを抗菌ペプチドと呼ぶ。この抗菌ペプチドは抗生物質への耐性を持つ細菌にも抗菌性を示す場合が多く、医療・創薬等の広い分野での応用が期待されている。しかし、大腸菌を宿主として遺伝子組換え生産する際には、抗菌ペプチドが宿主に働きかけることで、しばしば発現量が低下することが知られている。

線虫由来の 31 アミノ酸残基からなる抗菌ペプチド cecropin P1 (CP1) は、幅広い細菌に対して強い抗菌活性を示すことが知られており、抗菌ペプチドの作用機序や構造解析などの基礎研究に広く用いられてきた。CP1 の遺伝子組換えによる大量生産技術の確立は、CP1 の医療や創薬分野での応用への可能性を広げる技術として期待される。しかしながら、我々は大腸菌を宿主として用いた CP1 の組換え体の大量生産では、その毒性のため生産効率が著しく低いことを報告した（Baek MH et al, 2016, *J. Pept. Sci.* 22, 214-221）。

（研究内容）

遺伝子組換え抗菌ペプチドの大量生産の障害となる毒性の低減、細胞内在性のプロテアーゼによる分解の抑制を行う手法の一つとして、fusion partner との融合発現が広く活用されている。そこで本研究では、最近我々が種々の抗菌ペプチドを対象とした、大腸菌を宿主とした大量発現への有用性を報告した calmodulin を fusion partner として用い (Ishida H, 2016, *J. Am. Chem. Soc.* 138, 11318-11326) 、CP1 の大量発現系の構築を試みた。

大腸菌を宿主とし T7 promoter を用い、N 末端 his-tag 付加 calmodulin と CP1 との間にプロテアーゼ切断部位を導入した融合タンパク質の発現系を構築した。同様のコンストラクトで構築した thioredoxin 融合発現系を比較すると、calmodulin 融合発現では CP1 の宿主大腸菌に対する毒性を明確に抑制可能であり、融合発現タンパク質の収量も著しく増加することが確認された。

現在 Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによる融合タンパクの精製、酵素による fusion partner と CP1 の切断、RP-HPLC を用いての最終精製と定量、分析を進めており、CP1 の収量を増加させる条件の検討を進めている。

fusion expression, cecropin P1 (CP1), anti-microbial peptides (AMPs)

講演番号：2A22a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A22 会場

緑膿菌 OprM LOOP2 に対する抗体可変領域の大腸菌における発現検討

Expression of recombinant anti-*Pseudomonas aeruginosa* OprM LOOP2 antibody variable fragments in *Escherichia coli*

○矢野 遥香、大須賀 悠希、良原 栄策、小島 直也、笹川 昇 (東海大学)
○ HARUKA YANO, YUKI OSUGA, EISAKU YOSHIHARA, NAOYA KOJIMA, NOBORU SASAGAWA (Tokai Univ.)

【目的】緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は多剤耐性能を持つことで知られており、その機能には多剤排出ポンプが大きく関与している。この多剤排出ポンプの機能を抑制すると薬剤存在下での緑膿菌の増殖が抑えられると考えられ、ひいては多剤耐性緑膿菌感染症の治療法開発に繋がると期待される。我々はこれまでに OprM の細胞外に面している領域(LOOP1、LOOP2)のうち LOOP2 に対するモノクローナル抗体遺伝子から可変領域(VH、VL)をクローニングし、これをリンカーでつなぎ合わせた単鎖抗体を構築した。さらにこの組換え単鎖抗体を、His-Tag や GST をタグとして大腸菌内で発現させることを試みたが、SDS-PAGE およびウエスタン解析の両方で目的とする単鎖抗体の発現を確認できなかった。そこで今回はその原因を追究するべく、VH、VL 可変領域の各々を独立して発現させることを試みた。
【方法】緑膿菌の多剤排出ポンプは、MexA、MexB、OprM と呼ばれる 3 つのタンパク質から構成されている。抗体可変領域の遺伝子の取得に用いたハイブリドーマは、OprM LOOP2 のアミノ酸配列をエピトープとするモノクローナル抗体を産生するものである。前回はタグ-VH-リンカー-VL およびタグ-VL-リンカー-VH の構造を持つコンストラクトの構築を行ったが、今回は GST-VH および GST-VL のコンストラクトを作成した。(VH/pGEX5x-1、VL/pGEX5x-1)。これを大腸菌 XL-1blue に形質転換させ、陽性クローンに対してタンパク質の発現誘導を行い、目的とする GST 融合タンパク質を発現させることとした。発現誘導は LB 培地に終濃度 0.1mM の IPTG を加え、37℃で 2 時間行った。その後、SDS-PAGE と抗 GST 抗体を用いたウエスタン解析を行うことで、目的とする GST 融合タンパク質の検出を行った。
【結果・考察】GST-VL に関しては、SDS-PAGE・CBB 染色において VL において目的のタンパク質と推定されるバンドが予想分子量の位置に確認された。更に、CBB 染色で確認されたバンドが抗 GST 抗体と交差することがウエスタン解析で判明した。一方で GST-VH は CBB 染色でバンドが確認できなかったが、ウエスタン解析では目的の位置にバンドが検出された。以上のことから、発現量に差があるものの、VH、VL 各々単独であれば GST 融合タンパク質の発現が可能であることが示唆された。今回の結果より、前回までの実験に用いたリンカー配列(GGGGSGGGGSGGGGS が 3 回繰返された配列)が組換えタンパク質の発現に悪影響を与えている可能性も考えられる。そのため、現在は組換え体の構造にリンカー配列を挿入した GST-リンカー-VH、GST-リンカー-VL という発現コンストラクトを構築し、組換えタンパク質発現実験を行うことを試みている。

Pseudomonas aeruginosa, single-chain variable fragment, Multidrug efflux pump

講演番号：2A22a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A22 会場

Protein A 担体を用いたマウスモノクローナル抗体の精製における溶出条件の検討

Optimization of elution conditions for mause monoclonal antibody purification by ProteinA affinity chromatography

○豊田 精宏、中田 文弥、小林 昭（東ソー（株））
○Kiyohiro Toyoda, Fumiya Nakata, Akira Kobayashi (Tosoh Corp.)

【目的】モノクローナル抗体は、医薬品や診断薬として広く使用されている。医薬品では主にヒト抗体が使用されるが、診断薬ではマウス抗体など動物由来の抗体も使用されている。ヒト抗体の場合、初期精製でProtein A 担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより高純度に精製されているが、マウス抗体では溶出条件により変性や凝集化が起こる可能性があることから、Protein A 担体による精製は汎用されていない。今回、Protein A 担体を用い、マウスモノクローナル抗体の溶出条件を検討し、有用な知見が得られたので報告する。
【方法 】試料には細胞培養されたマウス抗体培養液を用いた。Protein A 担体を用いた抗体の精製では pH の低い酸性条件で溶出させる方法が一般的であるが、酸による変性が懸念される。変性を抑える目的で高塩濃度溶液や水溶性有機溶媒の添加などの溶出方法を試みたが、抗体を溶出させるには pH3.0 以下の溶出液を用いる必要があったため pH3.0 の条件における塩濃度の検討を行った。Tecan EVO システムに Protein A 担体 200μL を充填したカラムを 6 本装着し精製を行った。20 mmol/L りん酸塩緩衝液＋150 mmol/L NaCl（pH7.0）で平衡化した後、試料を負荷した。抗体以外の夾雑成分を溶出させた後、20～120 mmol/L クエン酸塩緩衝液（pH3.0）を用いて抗体を溶出させた。捕集した溶出液をサイズ排除クロマトグラフィーで分離し、変性と凝集化を確認した。また、溶出後の経時による変性、凝集化が疑われるため、捕集した溶出液（酸性条件）と中和処理した溶出液の放置安定性も確認した。
【結果】溶出液の塩濃度が高くなるとともに抗体単量体のピークの前に変性体と思われるピークが溶出し、凝集体の割合も増加した。20 mmol/L の溶出液では変性体、凝集体とも溶出が認められなかったことから低塩濃度の溶出液を用いることが有効との結論を得た。また、溶出液中の抗体の安定性に関して、今回用いた pH3.0 の溶出液の場合、短時間では大きな変化は認められなかったが、長時間では酸性条件下で徐々に変性体、凝集体の増加が確認できた。抗体の安定性を考慮すると溶出液の中和処理が有効であると考えられる。

ProteinA, mause monoclonal antibody

講演番号：2A22a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A22 会場

海産無脊椎動物グミ由来新規レクチンの分離精製とその特徴付け
Studies on purification and characterization of a novel lectin from marine invertebrates *Cucumaria echinata*
○矢崎 裕太、栗原 拓海、米倉 政美、上妻 由章（茨大農）
○Yuta YASAKI, Takumi KURIHARA, Masami YONEKURA, Yoshiaki KOUZUMA (Ibaraki Univ.)

（目的）
レクチンとは糖を認識し、結合するタンパク質の総称である。レクチンは、糖に対して特異的な結合能を示すことから、医学や生化学等の様々な分野で糖鎖の検出・細胞の同定などに応用されており、その目的のために新規なレクチンの探索が現在も進められている。本研究室ではナマコの 1 種であるグミ（*Cucumaria echinata*）から、これまでに 4 種の Ca 依存性レクチン CEL-I～CEL-IV を単離しているが、その特異性はいずれもガラクトース特異的であった。そこで本研究では、これらのレクチンとは異なる糖特異性を持つ新規レクチンを探索することを目的に、その探索と分離・精製及び特徴づけを行った。
（方法・結果）
新規レクチンを探索するために、グミの抽出液を 4 種のアフィニティー担体（Galactose, Lactose, Mannose, Fucose-Cellufine）に供し、結合タンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、Mannose 及び Fuc-Cellufine に結合する約 88 kDa のタンパク質の存在が確認された。そこで、Mannose-Cellufine を用いたアフィニティークロマトグラフィーおよび Q-Sepharose を用いた陰イオンクロマトグラフィーを行って精製した結果、708 g のグミより 0.75 mg の 88 kDa タンパク質が得られた。精製タンパク質を用いて、ウサギ赤血球に対する凝集活性を調べたところ、凝集活性（最低凝集濃度：6.56 μg / ml）を示し、このタンパク質がレクチンの 1 種であることが示唆された。糖特異性を評価するために、単糖および糖タンパク質存在下で、赤血球凝集活性を調査したところ、単糖ではマンノースとフコースで最も強く凝集が阻害（最低凝集阻害濃度：1.54 mM ）されたが、グルコースとガラクトースでも、ある程度凝集を阻害した。糖タンパク質ではオボアルブミン（同：125 μg/ml）で凝集阻害を示したが、フェツインとアシアロフェツインでは 500 μg/ml でも阻害しなかった。また EDTA 存在下で赤血球凝集活性を調査したところ、凝集活性は消失したことから、このレクチンは Ca 依存性であることが明らかになった。また、このレクチンの N 末端アミノ酸配列を 20 残基まで決定したが、相同性を示すタンパク質は見いだされなかった。
現在、このタンパク質について CNBr 分解を行って内部アミノ酸配列を決定し、その遺伝子配列について調査中である。

lectin, sea cucumber, purification

講演番号：2A22p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A22 会場

口腔外における苦味受容体 Tas2r の発現とその機能解析
Extraoral expression of the bitter taste receptors Tas2rs
○大泉 由佳[1]、八巻 美智子[2]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大・院農、[2]東北生活文化大家政)
○Yuka Oizumi[1], Michiko Yamaki[2], Hitoshi Shirakawa[1], Michio Komai[1] ([1]Tohoku Univ, [2]Tohoku Seikatsu Bunka Univ)

【目的】
五基本味の一つである苦味は主に毒物が有する味であり、味細胞に発現している苦味受容体 TAS2R (taste receptor type2) によって受容される。TAS2R は G タンパク質共役型受容体に属しており、ヒトでは 25 種類、マウスでは 35 種類が同定されている。近年、TAS2R は口腔だけではなく、気道、消化管、脳、精巣など様々な組織に発現しており、各組織において苦味物質に応答を示すことも報告されている。TAS2R は、口腔内で苦味を感知するセンサーとして機能するだけでなく、本受容体を介するシグナルにより様々な生理機能を発揮していることが予想される。しかしながら、口腔外組織における各 TAS2R の発現や機能は未だに充分に明らかになっていない。そこで、本研究ではマウスの口腔外組織における Tas2r の発現、およびそれらの組織における本受容体の機能解明を目的とした。
【方法】
C57BL/6NCrSlc マウス（8～12 週齢、雄、雌）の舌、肝臓、小腸、腎臓、肺、胃、精巣、脳（脳幹、小脳、大脳、海馬、視床下部、視床）組織を採取し、35 種の mTas2r の mRNA 量を定量 RT-PCR により測定した。また、マウス株化培養細胞（ミクログリア、マクロファージ、ライディッヒ細胞）での発現も同様に解析した。
【結果・考察】
肝臓において 4 種、小腸で 6 種、腎臓で 6 種、肺で 8 種、胃で 4 種、精巣で 9 種、脳で 8 種の mTas2r が発現していた。肝臓での 2 種、肺での 2 種、精巣での 1 種の mTas2r の mRNA 量は、舌での各 mTas2r mRNA 量と比較して高い傾向が観察された。また、小脳で 4 種の mTas2r mRNA 量が他の脳組織と比べ有意に高かった。また、株化マクロファージでは 2 種の mTas2r が発現しており、本細胞の機能に苦味受容体が関与する可能性が示唆された。

TAS2R, GPCR, Extraoral

発表責任者：駒井三千夫（mkomai@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A22p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A22 会場

セリン欠乏による Imsulin/IGF シグナル伝達減弱の分子機序
Molecular mechanism underlying attenuation of insulin/IGF signaling cascade caused by L-serine deficiency
○河野 唯[1]、阿比留 舞子[1]、濱野 桃子[1,2]、佐矢野 智子[3]、古屋 茂樹[1,4] ([1]九大農、[2]福岡女子大学、[3]理化学研究所 BSI、[4]九州大学イノベーティブバイオアーキテクチャーセンター)
○Yui KAWANO[1], Maiko ABIRU[1], Momoko HAMANO[1,2], Tomoko SAYANO[3], Shigeki FURUYA[1,4] ([1]Kyushu Univevrsity, [2]Fukuoka Women's University, [3]RIKEN BSI, [4]Innovative Bio-Architecture Center, Kyushu Univ.)

【背景・目的】セリン合成初発酵素 *Phgdh* の遺伝子を不活性化したノックアウト(KO)マウスは脳形態異常と全身の発達不全を伴い胎生致死に至る。我々は、内在性セリン合成の生理的意義及びその分子機序解明のため、*Phgdh* KO マウス胚から樹立した不死化線維芽細胞（KO-MEF）を用い解析を進めてきた。KO-MEF はセリン欠乏により、細胞増殖停止を経て細胞死に至る。その際に細胞増殖と生存に関与するシグナル伝達分子 Erk1/2 の著しい活性低下を示した。更に、マイクロアレイ解析により、セリン制限下では *Igfbp4* (Insulin like growth factor binding protein 4)の顕著な発現上昇が検出された。そこで本研究では Erk1/2 の上流である IGF シグナルに着目し、内在性セリン合成の欠乏による同シグナル伝達経路変化から KO-MEF の増殖停止と生存率低下を制御する分子カスケードの特定を目的とした。

【方法・結果】胎生 13.5 日齢 *Phgdh* KO マウス胚より樹立した不死化 KO-MEF を用いた。培地セリン制限条件に暴露した KO-MEF より RNA 及びタンパク質を調製し、定量 RT-PCR により IGF シグナル伝達経路関連分子の遺伝子発現解析およびウエスタンブロットによる IGF シグナル伝達経路構成分子についても発現解析を行った。その結果、*Igfbp4* はマイクロアレイの結果同様に定量的 PCR によってもセリン制限下において mRNA 発現増加が確認された。また、IGF シグナルの起点となる *Igf1* について制限後 24 時間で著しい mRNA 発現の低下を見出した。一方で受容体である *Igf1r* は制限条件でも発現変化を認めなかったが、同じく受容体として機能し得るインスリン受容体 *Ir* は有意な mRNA 発現増加が確認された。ウエスタンブロットによるタンパク質発現解析では、複数の構成分子について発現低下やリン酸化レベルの低下が認められ、同経路全体の活性減弱が推定された。これらの結果より、胚性線維芽細胞ではセリン欠乏により Igfbp4 の発現増加および *Igf1* の発現抑制を介して IGF シグナル伝達経路の減弱が惹起され、細胞増殖停止と細胞死に至る分子機序の一端となっていることが示唆された。

L-Serine, Insulin/IGF signaling, growth arrest

発表責任者：河野唯（2BE17439M@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A22p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A22 会場

マクロファージはオートファジーを介して炎症反応を制御する

Macrophages regulate inflammatory responses via autophagy

○米野 雅大、白木 琢磨、芦田 久（近畿大・院・生物理工）
○Masahiro Komeno, Takuma Shiraki, Hisashi Ashida (Grad. Sch. of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University)

オートファジーは細胞内の非特異的なバルク分解システムであるが、選択的な分解にも関わる。後者に関して、凝集タンパク質や細胞侵入性細菌は Ubiquitin で、不要ミトコンドリアは Parkin でマークされ、アダプタータンパク質である p62 によってオートファゴソーム(AP)に輸送されることがわかっている。しかし、ミスフォールドしていない使用済み酵素やシグナル伝達に関するタンパク質の選択的分解においては、まだ解明されていない点も多い。免疫系のシグナル伝達においては多くの伝達タンパク質が関与し、そのタンパク質の速やかな発現、分解が要求される。そこで我々は、選択的オートファジーが炎症反応においてどのように関与するのか検討した。

一部の慢性炎症性腸疾患の患者において、*Atg* (Autophagy related genes)遺伝子に変異が見い出されている。そこで、マウス由来マクロファージで AP 形成に関与する *Atg* 遺伝子をノックダウンしたところ、LPS 除去後の炎症性サイトカインの産生終結が遅延した。逆に、アミノ酸飢餓によりオートファジーを活性化したところ、産生量が早期に減少した。このことから、オートファジー関連タンパク質は、炎症シグナル伝達タンパク質と相互作用し炎症反応をコントロールしていることが示唆された。TLR (Toll-like receptor)シグナル経路のうち MyD88 依存型のものにおいて、TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)複合体は重要な役割を果たすことが知られている。炎症の活性化において TRAF6 は p62 と結合すること、また TRAF6-K63 のポリユビキチン化が見られることなどが報告されている。実際に、p62 と TRAF6 の相互作用を免疫沈降法で確認したところ、炎症反応のどの時期においても結合していた。さらに、p62 と共通するドメインを有しオートファジーの基質認識に関わるタンパク質である NBR1 が TRAF6 と相互作用することも判明した。NBR1-TRAF6 複合体は p62-TRAF6 複合体とは異なり、炎症回復時間によりその存在量が異なることが明らかになった。以上の結果より、TRAF6 が NBR1 と複合体を形成することでオートファジーにより分解され、炎症が終結するというモデルを提唱する。

Autophagy, TRAF6, NBR1

講演番号：2A22p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A22 会場

卵由来スフィンゴミエリンによる肝癌細胞死誘導およびその機構解析

Induction of hepatoma cell death by egg-derived sphingomyelin and its molecular mechanism

○山田 可奈子、山田 佳奈、髙宮 奈津子、三浦 豊（東京農工大学）
○Kanako YAMADA, Kana YAMADA, Natsuko TAKAMIYA, Yutaka MIURA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】スフィンゴミエリン（SPM）はスフィンゴ脂質の一種であり、卵や牛乳などの動物性食品に多く含有されている。近年の研究によって、スフィンゴ脂質の脂質メディエーターとしての機能が明らかにされつつあり、SPM にも注目が集まっている。すでに我々は、卵由来 SPM が肝癌細胞特異的に細胞死を誘導し、その作用が生体内でも有効であることを見出している。そこで本研究では、ラット腹水肝癌細胞をモデルとして SPM による細胞死誘導機構の解明を試みた。
【方法】ラット腹水肝癌細胞 AH109A 細胞をモデル肝癌細胞として用いた。SPM は、培地に添加して 48 時間培養することで AH109A 細胞に取り込ませた。実際に SPM が細胞に取り込まれているかは、LC-MS/MS を用いた解析によって確認した。このように SPM を取り込ませた AH109A 細胞を回収・洗浄し、通常の維持培地に再播種することで細胞増殖測定等の実験を行った。細胞増殖は WST-8 法にて測定し、細胞死形態の検出には Annexin V/PI 二重染色法を用いた。SPM の構造活性相関に関しては、各種化合物を SPM と同様に AH109A に取り込ませることで検討を行った。さらに詳細な細胞死誘導機構を解析するため、各種阻害剤（アポトーシス阻害剤、ネクロプトーシス阻害剤等）を用いるほか、ミトコンドリア膜電位や細胞内活性酸素量などの指標に関して検討を行った。
【結果・考察】 SPM を培地に添加して培養した AH109A 細胞では、細胞内 SPM 量の有意な増加が見られ、SPM が細胞内に取り込まれていることが確認された。この AH109A 細胞には細胞死が誘導され、細胞増殖も対照群と比較して有意に抑制された。細胞死の形態としては、SPM を取り込ませることによって PI 陽性のネクローシス細胞群及び後期アポトーシス細胞群が増加し、その後通常の維持培地にて培養を続けると Annexin V 陽性・PI 陰性の初期アポトーシス細胞群も増加することが判明した。これらの結果から、SPM によってネクロプトーシスまたはアポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。しかし、SPM 誘導性の細胞死はネクロプトーシス阻害剤（NSA）やカスパーゼ阻害剤（Z-VAD-FMK）の影響を受けなかった。そして SPM を取り込ませた AH109A 細胞では、ミトコンドリア膜電位の上昇や、細胞内活性酸素量の増加などの特徴も見られた。以上の結果より、SPM によって肝癌細胞に誘導されるのは典型的なネクロプトーシスやアポトーシスとは異なる細胞死であると考えられる。

sphingomyelin, cell death, hepatoma

発表責任者：三浦　豊（eiyouym@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2A22p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A22 会場

癌細胞と正常細胞の相互作用による MMP-2 産生誘導機構の解析

Analysis of the induction mechanism of MMP-2 production by interaction between cancer cells and normal cells.

○島崎 なつみ、酒井 史彦、三浦 豊（東農工大農）
○Natsumi SHIMAZAKI, Fumihiko SAKAI, Yutaka MIURA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】悪性癌細胞が転移する過程には、周辺環境との相互作用が関与していることが明らかにされている。そこで、本研究では癌細胞と正常細胞の相互作用による悪性化の例として、ラット肝癌細胞とラット腸間膜由来中皮細胞との相互作用によるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)産生誘導現象を対象とし、その詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。また癌細胞膜上に存在する MMP 産生誘導因子による癌細胞悪性化への影響についても検討した。

【方法】ラット肝癌細胞 AH109A 細胞をモデル肝癌細胞、ラット腸間膜由来中皮細胞 (M-cell)をモデル正常細胞として用いた。Donryu 系雄ラットの腸間膜より M-cell を採取し、10 %FBS / MEM にてコンフルエントな単層を形成するまで約 7 日間培養した。そこに AH109A を共培養させて血清を含まない MEM で 48 時間培養後、培養上清を回収して Gelatin Zymography 法によって MMP-2 活性を調べた。また、セルカルチャーインサートを用いて非接触条件下で M-cell と AH109A を共培養させ、前述の接触条件下との MMP-2 活性を比較した。さらに siRNA を用いて EMMPRIN (CD147) をノックダウンした AH109A を M-cell と接触条件下で共培養させ、MMP-2 活性への影響を調べた。なお EMMPRIN の発現抑制効果は Western Blotting 法を用いて確認した。AH109A 上の EMMPRIN をノックダウンした際の AH109A の増殖能は WST-8 法で、接着能及び浸潤能は M-cell との共培養後に M-cell の下に潜り込んだ AH109A 細胞数を数え、1cm^{2}に当たりに換算して検討した。

【結果と考察】

AH109A と M-cell の共培養時の MMP-2 活性は M-cell 単独培養時と比較して有意に上昇した。また両細胞の接触・非接触の影響については、セルカルチャーインサートにより接触を断つことで MMP-2 産生誘導が観察されなくなったことから、AH109A と M-cell の接触が MMP-2 活性の上昇に必要であることが示唆された。そこで我々は AH109A 細胞膜上に存在する MMP 産生誘導因子である EMMPRIN に着目し、siRNA を用いて EMMPRIN をノックダウンした AH109A を M-cell と共培養させた。その結果 MMP-2 活性に減少傾向が確認され、AH109A 上の EMMPRIN が M-cell による MMP-2 産生を促進する可能性が示唆された。また現在、EMMPRIN の発現抑制による AH109A の増殖能、接着能及び浸潤能への影響について検討し、EMMPRIN と癌細胞悪性化との関係についてさらなる解析を試みている。

Cancer metastasis, Matrix metalloproteinase-2, EMMPRIN

講演番号：2A22p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A22 会場

間葉系幹細胞の細胞外基質の硬さに対する応答における SORBS ファミリータンパク質の役割

Roles of SORBS proteins in ECM-stiffness-dependent responses in mesenchymal stem cells

○黒田 美都[1,3]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1,2]（[1]京大院農、[2]京大 iCeMS、[3]学振研究員 DC1）
○Mito KURODA[1,3], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMs, Kyoto Univ., [3]JSPS fellow (DC1))

間葉系幹細胞はコラーゲンなど細胞外マトリックス(ECM)の硬さによって分化方向性が調節されている。例えば軟らかい ECM 上で培養した場合、間葉系幹細胞は脂肪細胞へ分化しやすく、硬い ECM 上では筋芽細胞や骨芽細胞へと分化しやすい。これまで、細胞と ECM の接着部位に局在しアクチン繊維と結合するタンパク質ビンキュリンが硬い ECM 上ではアクチン繊維高親和型の構造へと変化し転写因子 YAP/TAZ の核局在を促進すること、ビンキュリンが YAP/TAZ を介して ECM の硬さに応じた間葉系幹細胞の分化を制御していることを報告してきた[Kuroda et al. J. Cell Sci. 2017]。しかし、ビンキュリンを含む接着斑複合体装置がどのように ECM の硬さを感知して、シグナル伝達を制御しているのか不明な点が多い。本研究では接着斑領域でビンキュリンと相互作用するタンパク質ファミリー分子、ビネキシン(Sorbs3)および CAP (Sorbs1)に注目し、これらが間葉系幹細胞におけるビンキュリンの構造変化と YAP/TAZ の核局在に与える影響を調べた。

マウス骨髄由来間葉系幹細胞 ST2 を間葉系幹細胞のモデルとして用い、ビネキシンおよび CAP の安定発現抑制細胞を樹立した。まず、ビネキシンおよび CAP がビンキュリンの構造変化に与える影響を調べるため、細胞を TritonX-100 含有緩衝液で処理した。本処理により、アクチン繊維低親和型ビンキュリンは除去され、アクチン繊維高親和型ビンキュリンは残る。処理後の細胞を免疫染色した結果、ビネキシンおよび CAP の発現抑制は接着斑に局在する全ビンキュリン量には有意な影響を与えなかった一方、アクチン繊維高親和型のビンキュリン量は、ビネキシンおよび CAP、いずれの発現抑制によっても減少した。このことから ST2 細胞においてビンキュリンの構造変化にはビネキシンおよび CAP が必要であることがわかった。次にビネキシンと CAP が転写因子 YAP/TAZ の核局在に与える影響を調べた。いずれの発現抑制によっても 8.7 kPa 以上の硬い基板上で YAP/TAZ の核局在が減少した。このことから、ビネキシンおよび CAP は硬い ECM 上での YAP/TAZ の核局在を促進することがわかった。次に細胞分化に与える影響を調べるため、硬い基板であるプラスチック上で、ビネキシンおよび CAP の発現抑制細胞を脂肪細胞へと分化誘導した。その結果、CAP の発現抑制は、ビンキュリンの発現抑制同様に、脂肪細胞への分化を促進した。一方で、予想に反して、ビネキシンの発現抑制は脂肪細胞への分化を抑制した。以上の結果より、CAP はビンキュリン同様に ECM の硬さに応答して、YAP を介して硬い ECM 上での脂肪細胞への分化を抑制していることが示唆された。一方でビネキシンは YAP/TAZ の核局在の調節とは独立して、脂肪細胞分化を促進することを見出した。

Mesenchymal stem cells, focal adhesion, differentiation

発表責任者：黒田美都（mkuroda@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A22p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A22 会場

普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 の哺乳動物における機能解析
Functional analysis of the conserved ribonuclease, RNase T2, in mammals.
○小川 哲弘[1]、岩本 京夏[1]、隅倉 敦美[1]、内田 萌菜[2]、藤井 渉[3]、チェンバーズ ジェームズ[2]、米澤 智洋[2]、日高 真誠[1]、角田 茂[2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大院・農生科・獣医、[3]東大院・農生科・応動)
○Tetsuhiro Ogawa[1], Keika Iwamoto[1], Atsumi Sumikura[1], Mona Uchida[2], Wataru Fujii[3], James Chambers[2], Tomohiro Yonezawa[2], Makoto Hidaka[1], Shigeru Kakuta[2] ([1]Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Vet. Med., Univ. of Tokyo, [3]Dept. of Anim. Res. Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】RNase T2 は、タカジアスターゼ原末から発見された日本発の分泌型リボヌクレアーゼである。ほぼ全ての生物に存在することから、生物学的に重要な役割を持つと考えられるが、未だ不明な点が多い。カビにおいては、細胞外 RNA を分解して栄養素として取り込む際に利用される。一方、ナス科・バラ科植物では自家不和合性に関わる。更に、我々の研究室では、出芽酵母 RNase T2 が余剰リボソームの分解に関わることを本大会で報告している[1)-3)]。このように、RNase T2 は生物種により異なる多様な機能を発揮する。ヒトにおいては、RNase T2 は当初がん抑制因子として同定された。その後、神経変性疾患の一種である「先天性嚢胞性白質脳症」患者において、RNase T2 の機能異常が認められた。更に、*RNASET2* 遺伝子座の一塩基多型が「白斑症」「バセドウ病」「クローン病」の発症と相関することも報告され、RNase T2 の異常が様々な疾患と関連することが示唆された。そこで、このうち遺伝子欠損に由来する「先天性嚢胞性白質脳症」の発症機構解明を目的とし、RNase T2 欠損マウスの作製を試みた。また、得られた情報に基づき細胞レベルでの検証を行った。以上の成果を通して、普遍的リボヌクレアーゼである RNase T2 の、哺乳動物における根幹的役割を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】マウスにおいては、RNase T2 は遺伝子重複により高度に保存された二つの遺伝子にコードされている。そこで、RNase T2 の触媒残基をコードするエキソン 3 を標的とし、CRISPR/Cas9 法により両遺伝子の同時破壊を行うことにより、RNase T2 欠損マウスの作出に成功した。得られた欠損マウスでは、予想に反してヒト患者の遺伝学的解析から想定された「先天性嚢胞性白質脳症」は観察されなかった。一方で、肝脾腫などの免疫異常疾患の自然発症が認められた。また、RNase T2 の欠損により、特定の刺激に対する免疫応答性が変化することを個体、細胞レベルで見出した。こうした異常は、RNase T2 による RNA 分解が妨げられた結果と考えられ、現在解析を進めている。

1) 陣内ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集
2) 陣内ら、日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集
3) 赤川ら、日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集

ribonuclease, genome editing, immune response

発表責任者：小川　哲弘（atetsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A22p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A22 会場

高濃度のグルコース存在下におけるフルクトースの脂肪組織由来幹細胞の脂肪分化に与える影響
Effect of fructose on adipogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells in high glucose concentration

○山口 貴史、今西 陽亮、江藤 望、服部 秀美（宮崎大農）
○Takahumi YAMAGUCHI, Yousuke IMANISHI, Nozomu ETOU, Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ. Faculty of Agriculture)

【目的】2 型糖尿病患者の血中フルクトース濃度は、健常者のものと比較して有意に高いことが報告されている。フルクトースの過剰摂取は、内臓脂肪の蓄積を促進し、慢性炎症や肥満、メタボリックシンドロームを引き起こすことが知られているものの、皮下脂肪組織に関するフルクトースの影響についての研究報告は少ない。そこで本研究では、マウスの鼠径部より単離した脂肪組織由来幹細胞(ASCs)を用いて、フルクトースの脂肪分化に対する影響を検討した。
【材料および方法】5 週齢の C57BL6/N マウスの鼠径部より単離した皮下脂肪組織由来幹細胞(ASCs)を、フルクトースの濃度が異なる高濃度のグルコース含有脂肪細胞分化誘導培地を用いて分化させた。分化誘導後 3,7 日後の脂肪分化マーカー(adiponectin、LPL、PPARγ、C/EBPα)とグルコーストランスポーター(GLUT1、4、5、8、10)の mRNA 発現量を RT-PCR により測定した。また、培養上清中の adiponectin とケモカイン(CCL4、CXCL1)の分泌量を ELISA により測定した。
【結果】フルクトースによる ASCs の脂肪分化への影響を調べるために、脂肪分化マーカーの発現を測定したところ、フルクトースの濃度が高くなると PPARγの発現量が低下した。また、adiponectin の分泌量も同様に減少していた。次に、ASCs における糖の取り込み能への影響を調べるために、GLUTs の mRNA 発現量を比較した。その結果、全ての培地条件で GLUT5 の mRNA 発現は確認出来なかった。さらに、フルクトースの存在下で一時的に GLUT4 の発現が低下したものの、他の GLUTs の発現には影響を与えなかった。また、フルクトースと炎症との関連を明らかにするためにケモカインの分泌能の変化を調べたところ、フルクトースの存在によって CCL4 の分泌量が低下した。
【考察】以上の結果から、皮下脂肪組織由来幹細胞に対して、フルクトースは脂肪分化を促進させる作用はなく、逆に抑制作用を有することが明らかとなった。また、ケモカインの分泌能の結果から考えても、あくまでも皮下脂肪組織由来幹細胞に対して炎症を惹起させる効果はないのではと考えられた。また、このフルクトースによる分化抑制効果には、GLLUT5 が関与しているのではないかと推測していたが、GLUT5 の明らかな発現は観察されなかった。このことから他の GLUTs が影響しているのではないかと考えられるが、今回の研究結果からは詳細は不明であった。今後、フルクトースの ASCs に対する作用機序を明らかにするとともに、*in vivo* による検討が必要であると考えられる。

Adipose tissue-derived stem cells, Fructose, Adipogenic differentiation

発表責任者：服部　秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A22p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A22 会場

運動・温熱・栄養条件の変化に応答した新規マイオカイン CXCL10 の発現制御

Exercise, heat stress and nutrition-dependent CXCL10 regulation in skeletal muscle

○石内 友里、園田 彩乃、辻村 和希、小松 愛海、能勢 千晶、根建 拓（東洋大生命）
○Yuri ISIUCHI, Ayano SONODA, Kazuki TSUJIMURA, Narumi KOMATSU, Chiaki NOSE, Taku NEDACHI (Toyo Univ.)

【背景】近年、加齢による骨格筋量低下（サルコペニア）の発症機序のひとつとして、骨格筋周辺の毛細血管量の減少が注目されている。実際、加齢にともなって骨格筋周辺の血管内皮細胞のアポトーシスが亢進することが報告されているが、この加齢による毛細血管減少メカニズムについては、未だに不明な点が多い。最近、我々は血管新生抑制活性を持つ Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)が、骨格筋より分泌される新規マイオカインであることを発見した。CXCL10 の血中濃度は加齢によって上昇することが報告されており、併せると、加齢により骨格筋周辺の CXCL10 発現量が上昇することで毛細血管量が減少、これがサルコペニア亢進の一因となっているという仮説が考えられる。本研究では、これまでに毛細血管量を調節することが分かっている収縮刺激、グルコース濃度の変化、温熱刺激が骨格筋の CXCL10 発現にどのような影響を与えるかについて精査することを目的とした。
【方法・結果】まず、マウス骨格筋細胞である C2C12 筋管細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS)による収縮刺激を与えたところ、CXCL10 発現量は大きく減少することが明らかとなった。さらにマウスに Treadmill による強制走行を負荷し、骨格筋における CXCL10 遺伝子発現量を解析したところ、特に遅筋において CXCL10 遺伝子発現量が有意に減少することが分かった。さらに、C2C12 筋管細胞の細胞外グルコース濃度が上昇すると CXCL10 発現量が増加、42℃の温熱刺激の負荷は CXCL10 発現量を減少させることも明らかとなった。次に、マウス血管内皮細胞モデル MSS31 細胞を用いて CXCL10 量増減の生理的意義を調べた。MSS31 細胞への CXCL10 添加が、細胞の生存能減少を引き起こすことを確認した後、EPS 処理を行った C2C12 細胞の conditioned medium (EPS-CM)の効果を解析した。その結果、EPS-CM 添加により MSS31 細胞の生存能上昇が観察され、この効果は EPS によって減少した CXCL10 を補償的に添加することで消失した。併せると、少なくとも骨格筋収縮依存的な CXCL10 量の減少は、血管内皮細胞モデルの生存を制御しうる重要な変化であると考えられる。
【考察】これまでに運動や温熱刺激は毛細血管量を増加させ、逆に高血糖状態はその量を抑制することが分かっており、今回我々が見出した CXCL10 量の変化とよく一致している。これまで毛細血管量の制御には Vascular endothelial growth factor (VEGF)など様々な因子の関与が報告されているが、今回明らかとなった骨格筋における CXCL10 の発現変動は、骨格筋周辺の毛細血管量を制御する重要なメカニズムの一つである可能性が考えられる。

stress, myokine, skeletal muscle

発表責任者：根建　拓（nedachi@toyo.jp）

講演番号：2A22p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A22 会場

ルーメン内繊維分解細菌間相互作用の NMR メタボローム解析を用いた研究
Research of rumen fibrolytic bacterium interaction by NMR metabolomics

○稲村 勇雅[1]、山野 めぐみ[1]、北田 直也[1]、久米田 博之[2,3]、熊木 康裕[2]、大西 裕季[2]、塚本 卓[1,2,3]、菊川 峰志[1,2,3]、出村 誠[4]、福間 直希[4]、村住 侑毅[4]、小池 聡[4]、小林 康男[4]、相沢 智康[1,2,3] ([1]北大院生命科学院、[2]北大院先端生命、[3]北大 GI-Core ソフトマターGS、[4]北大院農学研究院)
○ Yuga INAMURA[1], Megumi YAMANO[1], Naoya KITADA[1], Hiroyuki KUMETA[2,3], Yasuhiro KUMAKI[2], Yuki ONISHI[2], Takashi TUKAMOTO[1,2,3], Takashi KIKUKAWA[1,2,3], Makoto DEMURA[4], Naoki FUKUMA[4], Yuki MURAZUMI[4], Satoshi KOIKE[4], Yasuo KOBAYASHI[4], Tomoyasu AIZAWA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ., [2]Fac. Adv. Life Sci. Hokkaido Univ., [3]Soft Matter GS, GI-CoRE hokkaido Univ., [4]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【背景・目的】反芻動物は自身が摂取した植物繊維を第一胃(ルーメン)の共生細菌に分解及び発酵させる事によって栄養源として転換する。宿主の維持エネルギーのおよそ 70%をルーメンで産生される発酵産物でまかなう事から、ルーメン内細菌による植物繊維分解、発酵メカニズムの解明は重要な基礎的知見となる。植物繊維の一次分解者である繊維分解性細菌は、ルーメン内繊維分解において特に重要な存在である。一方で、このような繊維分解菌は非繊維分解菌とコミュニティを築き協調的に繊維分解を行うことが知られている。しかし、その共生のメカニズムには未知の点も多い。これまでの研究で繊維分解菌 *Fibrobacter succinogenes*、非繊維分解菌 *Selenomonas ruminantium*、新規細菌群 U2 の 3 者が、ウシルーメン内の繊維分解コンソーシャムの重要構成細菌であることが特定されている[1,2]。本研究ではこれら三菌種の分離菌株を用いて、2 者及び 3 者共培養試験による繊維分解コンソーシャムモデルを構築し、その培養液の NMR を用いたメタボローム解析を行い、ルーメン内繊維分解コンソーシャムにおける細菌間相互作用の解明を試みた。

【方法】*F. succinogenes* S85 株、新規細菌群 U2 に属する R-25 株、*S. ruminantium* S137 株の 3 菌株とイナワラを基質とした培地もしくは合成培地、ルーメン液含有培地を用いて、嫌気性条件下で各菌株の単独培養試験、いずれかの 2 菌株による 2 菌共培養試験、および全ての菌株を混合した 3 菌共培養試験を行った。48 時間もしくは 96 時間培養を行った後、それぞれのサンプルを遠心し、その上清に標準物質としてトリメチルシリルプロパン酸-d4 (TSP)を加えて NMR 測定を行った。それぞれの ^{1}H NMR スペクトルは、プレサチュレーションを用いた 1D NOESY で測定した。代謝物の同定と定量は Chenomx 社製のソフトウェアを用いて行った。

【結果】^{1}H NMR スペクトルから 33 種の代謝物の同定と定量に成功した。続いて主成分分析を行い、共培養時に重要な因子の分析を進めた。まず、*F. succinogenes* S85 株の単独培養で蓄積されるコハク酸が、*S. ruminantium* S137 株との共培養時に消費され、プロピオン酸が多く生成される事が確認された。また R-25 株と *S. ruminantium* S137 株の 2 種においてキシロビオースやスクロースに対する嗜好性が異なる事も確認された。この嗜好性の違いが 3 菌共培養時の *F. succinogenes* S85 株の活性化に繋がると考えられる。

[1] Satoshi Koike, Sayo Yoshitani, Yasuo Kobayashi, Keiichi Tanaka, FEMS Microbiol. Lett., 229, 23-30, 2003
[2] Takumi Shinkai, Takaaki Ueki, Yasuo Kobayashi, Anim. Sci. J., 81, 72-79, 2010

NMR, Rumen, Metabolomics

発表責任者：相沢智康（aizawa@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A22p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A22 会場

線虫のカルシニューリンが関わる寿命制御機構の解析
Role of calcineurin in regulating the lifespan in *C. elegans*
○河田 小茄実[1]、近藤 春佳[2]、久米 一規[2]、Blackwell Keith[3]、水沼 正樹[2] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研、[3]ハーバード大学)
○ KONAMI KAWATA[1], HARUKA KONDO[2], KAZUNORI KUME[2], KEITH BLACKWELL[3], MASAKI MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. grad. sch., [3]Harvard Univ.)

超高齢社会を迎えた現在、健康寿命の延長を実現するため老化の仕組みの全容解明が急がれている。寿命研究の成果は、単に寿命メカニズムの解明のみならず、老化に伴う各種疾患（生活習慣病やがん）の発症機構の理解やその予防・治療に役立つことが期待される。老化・寿命の研究において酵母や線虫などのモデル生物が用いられており、世界中で活発に研究が進展している。線虫は体長 1mm ほどの多細胞生物であり、その特徴として以下の点が挙げられる。1．表皮、神経、筋肉、消化器官、生殖器官を持ち、殆どが雌雄同体であるため繁殖が容易である。2．RNA 干渉により容易に遺伝子破壊の表現系を作り出すことが可能である。3．寿命が最長 1 カ月程度であり、寿命研究に最も適した多細胞モデル生物である。

これまでに我々のグループでは線虫を用いて寿命や酸化ストレス防御に携わる転写因子 SKN-1（ヒト Nrf ホモログ転写因子）の活性制御に関わるキナーゼやホスファターゼの同定を行うため、RNAi 法によりそれらの遺伝子機能をノックダウンさせると SKN-1 の活性を上昇させるものをスクリーニングした。その結果、mTORC2(mammalian target of rapamycin complex 2)の構成因子 Rictor やカルシニューリン(免疫抑制剤 FK506 のターゲット)など興味深い因子が取得され、これらによる SKN-1 を介した新規寿命制御の存在が示唆された。そこで、本研究ではカルシニューリンに着目し、SKN-1 を介した寿命制御メカニズム解明を目的とする。

野生株、*skn-1* 変異株、*daf-16*（FoxO 転写因子）変異株、*hlh-30*（オートファジー関連転写因子）変異株を用いて RNAi 法により線虫カルシニューリンである TAX-6 をノックダウンし、寿命への影響を調べた。その結果、野生株と *daf-16* 変異株、*hlh-30* 変異株の寿命が延長した。一方、*skn-1* 変異株では寿命延長は観察されなかった。したがって、TAX-6 は SKN-1 を介して寿命を負に制御していることが予想された。また、TAX-6 ノックダウンにより野生株の熱ストレス耐性が増加し、酸化ストレス耐性は減少したことから、TAX-6 は熱ストレス耐性を負に、酸化ストレス耐性を正に制御していることが予想された。現在、線虫のカルシニューリンが関わる寿命制御メカニズムについてさらに解析中である。

calcineurin, longevity, SKN-1

講演番号：2A22p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A22 会場

エンドウヒゲナガアブラムシ（*Acyrthosiphon pisum*)の自然免疫系における Toll 受容体と Spaetzle リガンドの機能解析
Analysis of Toll receptors and Spaetzle ligands in innate immunity of pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*)
○竹下 勇斗[1]、河部 陽平[1]、丸山 航平[1]、和田 崇史[2]、志和 睦[2]、河野 強[1]、岩崎 崇[1]([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○ Yuto TAKESHITA[1], Yohei KAWABE[1], Kohei MARUYAMA[1], Takafumi WADA[2], Mutsumi SHIWA[2], Tsuyoshi KAWANO[1], Takashi IWASAKI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Tottori. Univ., [2]Tottori Univ.)

【背景・目的】昆虫は、抗原抗体反応のような獲得免疫系を有していないが、微生物の感染などから自己を防衛するために自然免疫系を発達させている。Toll 経路、Imd 経路は昆虫の主要な自然免疫応答経路であり、前者は真菌・グラム陽性細菌、後者はグラム陰性細菌をそれぞれ認識し、選択的な免疫応答(抗菌性ペプチドの発現など)を誘導する。しかし、エンドウヒゲナガアブラムシ(*Acyrthosiphon pisum*)のゲノム解読の結果、*A. pisum* では Imd 経路の関連遺伝子が大幅に欠損していることがわかり、アブラムシは Toll 経路のみで免疫応答を行っている可能性が示唆された。そこで我々の研究室では、アブラムシ防除における分子標的として、Toll 経路の中心的因子である Toll 受容体に着目した。アブラムシには、6 種類の Toll 受容体(ApToll)が存在するが、我々はこれまでの研究から ApToll1-1, 1-2 が免疫機構に関与している可能性が高いことを示した。一方で、他昆虫の研究では、Toll 経路において Spaetzle (Spz)と呼ばれるタンパク質が Toll 受容体のリガンドとして機能することがわかっている。そこで本研究では、ApToll のリガンド候補であるアブラムシ Spz (ApSpz)の特定を試みた。
【方法・結果】Toll 経路を活性化するリガンド Spz を特定するために、*A. pisum* に存在する 6 種類の *Spz* 遺伝子(*ApSpz1-1, 1-2, 2, 3, 4, 6*)に関してバイオインフォマティクス解析を行った。自然免疫系で機能する他昆虫 *Spz* との比較解析の結果、*A. pisum* では *ApSpz1-1, 1-2* が高い相同性を示した。Spz は分子内と分子間で S-S 結合を形成し、二量体として機能することがわかっている。本研究では、二量体形成に必要な Cys 残基数の保存性から、ApSpz1-2 に解析対象を絞って、研究を進めていくこととした。実際に、ApSpz1-2 が Toll 経路を活性化するかを検証するために、組換え ApSpz1-2 タンパク質を用いたレポーターアッセイを行った。レポータープラスミドとして、Toll 経路活性化によって発現誘導されることが知られているショウジョウバエの抗菌性ペプチド遺伝子のプロモーター(pDefensin, pAttacin, pDrosomycin)と、その下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。これらレポータープラスミドと、Toll 受容体(ApToll1-1, 1-2)発現プラスミドを、ショウジョウバエ S2 細胞に導入することで、レポーターアッセイに使用する細胞株を調製した。これらの細胞株に ApSpz1-2 を添加した際、ApToll1-1 発現細胞では、pDrosomycin 活性, pDefensin 活性, pAttacin 活性がそれぞれ 1.7 倍, 7.6 倍, 2.3 倍に、有意に上昇した。また、ApToll1-2 発現細胞では、pDrosomycin 活性, pDefensin 活性がそれぞれ 2.6 倍, 2.7 倍に、有意に上昇した。このことから、ApSpz1-2 は ApToll1-1, 1-2 の両受容体を介して、Toll 経路を活性化させることが示唆された。現在、より詳細な解析を行っている。

Toll receptor, Spaetzle ligand, innate immunity

発表責任者：岩崎崇（itaka@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A22p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A22 会場

培養始原生殖細胞株の樹立と CRISPR/Cas9 による eGFP ノックインニワトリの作製

Establishment of eGFP knock-in chicken by applying CRISPR/Cas9 system to cultured primordial germ cell line

○萩原 遥太、奥嵜 雄也、金岡 英徳、飯島 信司、西島 謙一 (名古屋大工)
○Yota HAGIHARA, Yuya OKUZAKI, Hidenori KANEOKA, Shinji IIJIMA, Ken-ichi NISHIJIMA (Nagiya Univ.)

【目的】 近年の目覚しいバイオ医薬品市場の拡大により、有用タンパク質を安価に大量に生産できる技術の開発が求められている。我々はニワトリの卵中に有用タンパク質を生産させ、生きたバイオリアクターとして利用するための技術開発を進めてきた。これまでにウイルスベクターを用いた遺伝子導入によりモデル抗体やエリスロポエチンなどを生産するニワトリの取得を行ってきた。一方でトランスジェニック後代取得効率の低さが問題となっており、代替方法としてニワトリ始原生殖細胞（PGC：Primordial Germ Cell）の利用を検討してきた。今回、PGCの*in vitro*で培養及び遺伝子導入とレシピエント胚へ移植する方法の検討を行った。
【方法と結果】 ニワトリPGCの培養法には様々な報告があるが、必ずしも再現可能とは言えない。Whyteらの開発したFAIcs培地を元に培養条件の検討を行い、2．5日胚の全血から半年以上増殖が可能なPGC様細胞株を複数樹立した。これらの細胞は凍結融解が可能であった。免疫染色や定量PCRで確認を行ったところ、PGCで高発現するCVHやPrdm14などは分離した直後のPGCと大差ないレベルであったことから、未分化・生殖細胞性ともに維持していると考えられた。次に樹立した細胞にCRISPR／Cas9システムを用いてeGFP遺伝子のノックインを行った。PGCで強く発現している遺伝子座を標的としてノックインを行った結果、内在性のプロモーター活性によりeGFPを安定的に強発現するニワトリPGC細胞株の樹立に成功した。一方、レンチウイルスを用いたランダムな遺伝子導入ではゲノムDNAへの組込みは可能であったがeGFPは発現しなかった。この樹立した細胞株をレシピエント胚に移植し、5．5日胚で解析を行った結果、生殖線中PGCのうち最大84％が移植したPGC由来であった。そこで移植した胚を孵化させキメラニワトリの取得を行った。成熟後、これらニワトリの精子を解析したところ、最大でゲノムあたり約0．6コピーのeGFP遺伝子の挿入が確認された。そこでキメラニワトリの精子を人工受精させトランスジェニックニワトリの取得を試みた。その結果49羽中14羽（29％）という非常に高い確率でトランスジェニックニワトリの取得に成功した。これらトランスジェニック個体のゲノムを解析したところ、予想通りeGFPは片アレルにノックインされており、もう一方のアレルは変異がなかった。これらの結果から樹立した細胞株を用いて種々の遺伝子改変ニワトリの作製が可能であると考えられた。

なお、本研究は科研費16H01253の助成を受け行われた。

Transgenic chicken, Primordial germ cells, CRISPR/Cas9

発表責任者：西島謙一（nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A22p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A22 会場

ニワトリにおけるカルシウム感知受容体 CaSR を介したコク味物質の受容
Perceptions of kokumi substances via calcium sensing receptor (CaSR) in chickens
○川端 二功、大森 光、川端 由子、西村 正太郎、田畑 正志 (九大院農)
○ Fuminori KAWABATA, Hikaru OMORI, Yuko KAWABATA, Shotaro NISHIMURA, Shoji TABATA (Kyushu Univ.)

【緒言】哺乳類の Calcium sensing receptor (CaSR)は細胞外カルシウムイオンを感知する受容体であるとともに、味細胞に発現して食品中の遊離アミノ酸やペプチド等のコク味物質を受容する受容体としても知られている。我々は産業動物として重要なニワトリの味覚受容機構を解明するため、二価の陽イオンやコク味物質に対するニワトリ CaSR 応答の解析を行った。

【材料と方法】ニワトリ *CaSR* 遺伝子を腎臓からクローニングした。リポフェクション法によりニワトリ *CaSR* が挿入されたプラスミドベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、一過的にニワトリ CaSR を強制発現させた細胞を作製した。ニワトリ CaSR 発現細胞に対してカルシウムイオン、マグネシウムイオン、フェニルアラニン及びグルタチオン等のヒト CaSR のリガンドを灌流し、その応答性をカルシウムイメージング法で解析した。

【結果と考察】ニワトリ CaSR は細胞外カルシウムイオン及びマグネシウムイオンによって活性化され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。また、フェニルアラニンやグルタチオンは細胞外カルシウムイオン存在下でニワトリ CaSR を活性化させることがわかった。これらの機能はヒト CaSR と一致しており、鳥類であるニワトリにもコク味物質を受容する受容体が存在することが示唆された。CaSR は種間を越えて存在する味覚受容体候補であることがわかったとともに、ニワトリ飼料にコク味物質が応用できる可能性が見出された。

taste, kokumi, chickens

発表責任者：川端　二功（kawabata@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A23a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A23 会場

抗肥満ホルモン FGF21 の新規発現制御因子の同定
Identification of novel transcriptional regulator of FGF21 gene
○清水 誠[1]、梅村 真理子[2]、高橋 勇二[2]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大農、[2]東薬大生命)
○MAKOTO SHIMIZU[1], Mariko Umemura[2], Yuji Takahashi[2], Jun Inoue[1], Ryuichiro Sato[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】
FGF21（fibroblast growth factor 21）は肝臓で合成・分泌される繊維芽細胞増殖因子である。FGF21 遺伝子の発現は、絶食や小胞体ストレスなどで亢進し、脂肪組織や肝臓に作用して糖・脂質代謝を活性化する。我々はこれまで、FGF21 が小胞体ストレス応答性転写因子 ATF4（activating transcription factor 4）の標的遺伝子であり、その発現制御機構を明らかにしてきた。ATF4 が属する CREB/ATF ファミリーは DNA 結合に重要な bZIP 領域が存在する転写因子である。いくつかの ATF ファミリーは ATF4 と共通の標的配列に結合し得ることが報告されている。これらの背景から、ATF4 以外にも FGF21 の発現を制御する新たな ATF ファミリーの存在が考えられた。
【方法・結果】
様々な食餌・刺激を与えたマウス肝臓の RNA を用いて、FGF21 及び ATF ファミリーの遺伝子発現解析を行った。その結果、ATF5（activating transcription factor 5）の発現が FGF21 と共通の栄養刺激で変動することを見出した。アミノ酸配列を比較したところ、ATF4 と ATF5 は DNA 結合領域の相同性が高いことが示された。ATF5 単独ではレポーターの活性化が見られなかったため、常時活性型の ATF5 を構築し実験を行った。肝臓細胞を用いた実験の結果、ATF5 の強制発現により FGF21 発現が増加することを見出した。他の ATF4 標的遺伝子の解析を行った結果、TRB3（tribbles pseudokinase 3）の発現は増加したが、ASNS（asparagine synthetase）や CHOP（C/EBP homologous protein）などの発現変動は認められなかった。さらにアデノウイルスを用いた動物実験の結果、ATF5 は個体レベルでも FGF21 の発現を亢進することが示された。FGF21 遺伝子のプロモーター解析の結果、ATF5 は ATF4 と共通の結合配列に作用することが示された。
ATF5 欠損マウスを用いて、様々な刺激による FGF21 遺伝子の発現を解析した。その結果、絶食や小胞体ストレスでは野生型マウスと比較して ATF5 欠損による FGF21 の発現変動は認められなかった。一方、脂肪肝モデル（メチオニンコリン欠乏食）では FGF21 の発現が ATF5 欠損マウスにおいて有意に低下した。このことから、絶食や小胞体ストレスでは FGF21 遺伝子の発現制御は他の転写因子（核内受容体 PPARα や ATF4)が有意であり、ATF5 は脂肪肝において選択的に機能する可能性が示された。

FGF21, ATF5, transcription

講演番号：2A23a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A23 会場

寒冷刺激に応答する新規転写因子の同定
Identification of novel transcription factor induced by cold exposure
○不野 歩美[1]、清水 誠[1]、毛受 佑斗[1]、梅村 真理子[2]、高橋 勇二[2]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東京大農、[2]東薬大生命)
○Ayumi FUNO[1], Makoto SHIMIZU[1], Yuto MENJOU[1], Mariko UMEMURA[2], Yuji TAKAHASHI[2], Jun INOUE[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The Univ of Tokyo, [2]Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)

【背景・目的】
栄養過多や運動不足などが要因となる生活習慣病の一つとして、肥満は様々な疾病の発症を引き起こす。これに高血圧、高血糖、脂質異常のうち 2 つ以上が加わったメタボリックシンドロームは、動脈硬化へとつながる確率が高い危険な状態である。肥満の予防や改善には脂肪の蓄積や脂質代謝の機構の解明が重要である。褐色脂肪組織はミトコンドリアを多く含み、熱産生に重要なタンパク質 UCP1(uncoupling protein 1)が存在する。褐色脂肪組織は、新生児に多いことが知られているが、近年ヒト成人にも存在し、保温機能に加えエネルギー代謝や体脂肪の調節に寄与していることが明らかにされた。さらに肥満度は褐色脂肪の活性と逆相関するとも報告されている。以上の点から褐色脂肪組織は抗肥満の標的として期待されている。

【方法・結果】
これまで我々は、抗肥満ホルモン FGF21 がストレス応答性転写因子 ATF4 の標的遺伝子であることを報告した。ATF5 はアミノ酸配列において ATF4 と高い相同性を持つ転写因子であり、肝臓で高発現することが報告されている。我々は ATF5 が肝臓に加え脂肪組織にも発現していることを見出した。ATF5 の再摂食時の発現は、脂肪組織の中でも特に褐色脂肪組織での増加が顕著であった。また、寒冷暴露での ATF5 の発現は白色脂肪組織で変化が見られないのに対し、褐色脂肪組織では有意に増加した。小胞体ストレスマーカーである ATF4 や BiP も同様に、寒冷暴露で褐色脂肪組織での発現が亢進したが、FGF21 は白色脂肪組織のみで有意に増加した。摂食と寒冷暴露は共に褐色脂肪細胞での熱産生を活性化することから、熱産生時における ATF5 のエネルギー代謝制御に関する実験を行った。野生型と ATF5 ノックアウトマウスを用いて寒冷暴露実験を行い、褐色脂肪組織における様々な遺伝子発現を解析した。熱産生に関する遺伝子の発現に変動は見られなかった。次に代謝ケージを用いた寒冷実験の結果、酸素消費量や二酸化炭素排出量に差は見られなかったが、呼吸交換比において変動が見られた。以上の結果から ATF5 が寒冷暴露時の褐色脂肪組織においてエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。

brown adipose tissue, cold exposure, thermogenesis

講演番号：2A23a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A23 会場

MIG12 による ACC 活性化機構の解析

Modulation of acetyl-CoA carboxylase activity by MIG12.

○平口 遥香、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院 農生科 応生化）
○Haruka HIRAGUCHI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【背景と目的】LXR (Liver X Receptor)は脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、MIG12 プロモーター領域に LXR 応答配列が存在すること、MIG12 が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた [1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC (Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させる。しかし、その詳細な分子機構はいまだ明らかになっていない。そこで今回我々は ACC1 の発現プラスミドを作製し、MIG12 との結合部位や ACC ポリマー化亢進に重要な領域を同定することを目的として研究を行なった。

【方法】始めに C 末端に 3×Flag tag を付加した ACC1 の deletion construct を作製した。それらと MIG12-RGS-His を HEK293 細胞にトランスフェクションし、両者の結合の有無を Flag 抗体を用いた免疫沈降実験により検証することで結合部位を絞り込んだ。次に、その領域を ACC1 全長から欠失させた deletion construct が MIG12 によるポリマー化亢進作用を受けるかを、タンパク質の高次構造を維持したまま検出する手法である Blue Native-PAGE にて検証することとした。

【結果と考察】ACC1(1-2383aa)には BC(Biotin carboxylase)ドメイン(154-655aa)、BCCP(Biotin carboxyl career protein)ドメイン(782-856aa)、CT(carboxyl transferase)ドメイン(1735-2231aa)の 3 つの機能ドメインが存在する。ACC1 は CT ドメイン同士の結合によってダイマー化し、それらダイマーが BC ドメイン同士で結合することによってポリマー化することが報告されている [2)]。したがって、まず BC ドメイン、CT ドメインと MIG12 の結合を免疫沈降実験により検討した。その結果、両者の結合はみられなかった。次に結合領域は BC ドメインと CT ドメインの間にあると予想し、数種類の deletion construct を作製して MIG12 との結合を検証した。その結果、ACC1 と MIG12 の結合部位は BC ドメインと CT ドメインの間にある 125 アミノ酸の領域(656-781aa)に絞られた。今後は、ACC1 全長から今回絞り込んだ結合領域を欠失させた deletion construct を作製し、MIG12 によるポリマー化亢進作用を受けるかを検証する予定である。

1）J. Inoue et al. *Mol.Endocrinol.* **25**. 995-1005 (2011)
2）Cho YS et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1):187-92. (2010)

MIG12, ACC, LXR

講演番号：2A23a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A23 会場

コール酸は体熱産生には影響を及ぼさずにマウスの体重増加を抑制する
Cholic acid suppresses body weight gain independent of thermogenesis.
○岡本 篤、増澤(尾﨑) 依、細野 崇、関 泰一郎（日大院・生資科・応生科）
○Atsushi Okamoto, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad. School)

<目的>胆汁酸は胆汁酸受容体に作用し、甲状腺ホルモンの活性化を介した熱産生、エネルギー代謝の向上により肥満を改善することが考えられている。本研究では胆汁酸の主要な構成成分であるコール酸が肥満モデルマウスの脂質やエネルギー代謝に及ぼす影響について検討した。
<方法>C57BL/6J マウス(8 週齢)に標準食(CRF-1)を与えて二週間予備飼育を行った。その後、高脂肪食を与える HFD 群、0.5 %コール酸添加高脂肪食を与える CA 群の 2 群を設定し、11 週間飼育して体重、肝臓・血漿中の脂質量、糞中の胆汁酸量を測定した。更に、短期間のコール酸の影響を検討する目的で上記の条件と同様の実験系を設定し、二日毎に CA, HFD を交換して給餌し、体重やオキシマックス等流量システムを用いた呼吸代謝、埋め込み型体温計を用いた体温の変化について検討した。また、q PCR 法による肝臓、褐色脂肪組織中の各種 mRNA 量の測定に加えて、糞中成分を GC/MS により分析した。
<結果>11 週間の試験期間中、HFD 群の体重は経時的に増加した。一方 CA 群の体重は、ほとんど変化しなかった。試験開始 7 週目と 8 週目に実施した糖負荷試験、インスリン負荷試験では、CA 群の初期血糖は HFD 群と比較し低値を示し、耐糖能の悪化も抑制された。CA 群の肝臓、血漿のコレステロールは HFD 群と比較し高値を示した。一方、胆汁酸合成酵素である CYP7A1, CYP8B1 の肝臓における mRNA 発現は HFD と比較して CA で低値を示した。肝臓の脂肪酸合成酵素(FAS)の mRNA 発現量も HFD 群と比較し低値を示したが肝臓トリグリセリド量は増加した。CA 群の褐色脂肪組織における脂質蓄積は抑制されたが、熱産生関連遺伝子の mRNA 量に差はなかった。コール酸の短期間の摂取によっても同様に摂取直後から体重は減少したが、HFD への交換により CA の投与を中止すると体重は直ちに増加した。CA の投与により体重が減少した期間に体温の変化はなく、褐色脂肪細胞の熱産生遺伝子の発現にも差はなかった。RER はコール酸摂取中にのみ減少し、脂質燃焼の増加が示唆されたが、総エネルギー消費は体重の減少にも関わらず変化しなかった。コール酸の摂取は糞への糖類の排出を増加させたことから、糖質と脂質の代謝バランスが変化して、体脂肪の燃焼が増加する可能性、また摂餌量がわずかに減少することから摂食行動が抑制される可能性などが考えられた。
<結語> コール酸は熱産生機能には影響せず、摂取中にのみ速やかに体重を減少させた。

cholic acid, obesity, thermogenesis

講演番号：2A23a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A23 会場

コール酸負荷によるラット回腸組織でのアディポネクチン集積
Accumulation of Adiponectin in Ileal Tissue in Rats Exposed to Cholic Acid
○橘田 真理[1]、加茂 佳恵[2]、趙 佳賢[2]、原 博[2]、石塚 敏[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Shinri KITTA[1], Yoshie KAMO[2], Gahyun JOE[2], Hiroshi HARA[2], Satoshi ISHIZUKA[2] ([1]Hokkaido Univ, Fac. Agric., [2]Hokkaido Univ.)

背景と目的：高脂肪食を摂取すると脂質吸収に寄与する一次胆汁酸の分泌量が増大し、その組成は加齢によりコール酸に偏る。一方、内臓脂肪型肥満では、脂肪細胞の肥大化に伴い、インスリン感受性亢進作用などを有するアディポネクチン（APN）の脂肪細胞からの分泌が抑制される。我々はこれまでに、コール酸添加食による高脂肪食摂取時の胆汁酸増加状態を模倣した実験から、脂肪細胞の肥大化を介さず、血漿 APN 濃度が低下することを見出した。胆汁酸による血漿 APN 濃度低下機構を明らかにすることは、代謝性疾患予防の作用点を探索する上で重要と考えられる。動脈硬化では、損傷部位に APN 受容体である T-カドヘリンが高発現することで APN を集積させ、結果として血漿 APN 濃度が低下すると報告されている。そこで、胆汁酸負荷により特定の血管や組織に APN が集積する可能性を検証した。
方法：近交系 WKAH/Hkm Slc 雄性ラットに、AIN-93G 準拠飼料と 0.05%コール酸添加食を与え 13 週間飼育した。解剖時に腹部大動脈から採血し、血漿 APN 濃度を ELISA で分析した。また、APN の分泌組織である脂肪組織を採取し、APN 遺伝子発現を解析した。胆汁酸負荷による APN 減少が系統に依存するか否かを判断するため、近交系 F344/Jcl 雄性ラットを用いて同様の実験系で 10 週間飼育し、腹部大動脈から採血して APN 濃度を測定するとともに、胸部大動脈組織、門脈組織、および消化管組織への APN 集積を ELISA で評価した。
結果と考察：WKAH/Hkm Slc ラットの摂食量、体重および脂肪組織重量に変化はなく、血漿でのアディポネクチン濃度はコール酸負荷により有意に低下することを確認した。そこで、遺伝子レベルにおいて、脂肪組織でのコール酸の負荷による APN 遺伝子発現の影響を解析したところ、群間に有意差は見られなかった。一方、F344/Jcl ラットにおいてもコール酸負荷による血漿 APN 濃度の低下を確認した。そこで、動脈硬化に関わる胸部大動脈組織と、胆汁酸の腸肝循環に関わる門脈組織に着目し、当該部位への APN 蓄積を検証したが、どちらの部位おいてもコール酸摂取による APN 集積の差は認められなかった。ところが、消化管組織での APN 蓄積を評価したところ、コール酸摂取により回腸粘膜組織で有意に増加することを見出した。さらに、同部位における T-カドヘリン受容体の遺伝子発現も増大することを確認した。これらの結果から、胆汁酸の腸肝循環に関与する回腸粘膜組織で、コール酸が T-カドヘリン受容体発現を増加させて APN を集積させる可能性が示された。

adiponectin, bile acid, T-cadherin

発表責任者：石塚　敏（zuka@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A23a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A23 会場

明暗シフトが生体機能に及ぼす影響
Effects of light-dark shift on biological function
○山本 幸佳[1]、沼田 実[1]、保田 倫子[2]、三浦 信彦[3]、高橋 統一[1]、平野 明伽音[1]、下位 香代子[1]（[1]静岡県大食、[2]椙山女学園大、[3]労働安全衛生総合研究所）
○Yukika YAMAMOTO[1], Minoru NUMATA[1], Michiko YASUDA[2], Nobuhiko MIURA[3], Tadakazu TAKAHASHI[1], Akane HIRANO[1], Kayoko SHIMOI[1]（[1]University of Shizuoka, [2]Sugiyama Jogakuen University, [3]National Institute of Occupational Safety and Health）

【目的】近年は人工照明の普及や 24 時間型社会への変化などにより、多くの人が夜間に活動している。光を浴びるサイクルが不規則になりがちな交代制勤務労働者（シフトワーカー）は、日中勤務労働者と比較して心血管疾患や肥満、乳がんなどの疾患のリスクが高くなることが報告されている（Mustafa M. *et al.*, *Exp. IOSR-JDMS*, 16(5), 64–70, 2017）。この原因は不規則な光暴露による日内リズムの撹乱が原因ではないかと予想されるが、その作用機構等も含め不明な点が多い。以前、当研究室では、暗期の光暴露によって時計遺伝子や血栓形成に関与する血液凝固・線溶系遺伝子の発現変動が起こることを報告している（Aoshima *et al.*, *Exp. Anim.*, 63(3), 331-338, 2014）。本研究では、シフトワークの不規則な光環境を参考に、雌性 BALB/c マウスに対して 2 日おきに昼夜逆転する 1 週間単位の明暗シフト条件（Day3,4,7 逆転）を構築し、生体機能への影響について検討した。
【方法】雌性 BALB/c マウス 6 週齢を搬入後、運動量計測装置 nano tag®（キッセイコムテック）をマウスの頸部皮下に埋め込み、動物個別飼育装置内において 12 時間ごとの明暗サイクル（ZT0-12：明期、ZT12-24：暗期）で 1 週間馴化させた。馴化期間終了後、対照群（通常条件）と明暗シフト群に分け群飼育した。4 週間後に nano tag®を取り出し、運動量および体温の変化を確認した。また、雌性 BALB/c マウス 6 週齢を同様に馴化し、対照群と明暗シフト群に分け 4 週間群飼育後、解剖を行い、肝臓、心臓、血液を採取した。時計遺伝子の発現量及び線溶系遺伝子発現量は、Real-time PCR 法により定量し、両群の比較を行った。さらに、自動分析装置（TBA-10FR,(株)東芝）を用いて血液生化学検査を行った。（ZT：Zeitgeber Time、点灯開始時刻を ZT0 とする。本研究では午前 8 時）
【結果・考察】nano tag®を用いた運動量および体温の計測では、対照群で確認された明確な活動期、休眠期のサイクルが明暗シフト群では消失しており、明暗シフトによる活動のリズムの撹乱が確認された。次に、対照群の肝臓及び心臓の時計遺伝子及び線溶系遺伝子 *Pai-1* の発現を調べた結果、発現が撹乱していることが確認された。これらの結果は、明暗シフトが生体内のリズムを撹乱させていることを示唆している。また、血液生化学指標については両条件下でほとんど差異がなかったが、明暗シフト条件下で飼育したマウスの血漿中の物質 X の濃度は、対照群に対し有意に減少していた。現在、物質 X の低下が何を意味しているか検討中である。

Circadian rhythm, light-dark cycle, *Pai-1*

発表責任者：下位 香代子（shimoi@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A23a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A23 会場

摂食時間制限による肥満予防メカニズムの解明
Prevention of obesity by time-restricted feeding.
○小島 貴之、守川 直樹、渡邉 諒、増澤 (尾﨑) 依、細野 崇、榛葉 繁紀、関 泰一郎 (日本大学)
○Takayuki KOJIMA, Naoki MORIKAWA, Ryo WATANABE, Yori MASUZAWA-OZAKI, Takashi HOSONO, Shigeki SHIMBA, Taiichiro SEKI (Nihon Univ.)

＜目的＞演者らは、マウスに高脂肪食を暗期 8 時間のみに給餌する群では、自由に摂食させる群と比較して、体重および内蔵脂肪組織重量の増加が著しく抑制されることを見出した。さらに、肥満により変化する呼吸交換比 (respiratory exchange ratio ; RER)の日周リズムが改善、暗期における酸素消費量および二酸化炭素排出量を増加させ、エネルギー代謝が亢進することを明らかにした。また、高脂肪食を摂食させる時間を暗期 8 時間のみに制限すると、時計遺伝子として中心的な役割を担う Bmal1 mRNA の発現パターンが正常化し、代謝異常も低減することが報告されている。しかしながら、摂食時間の制限による肥満の改善が、時計遺伝子の位相の修正によるのか、あるいは、肥満の改善による時計遺伝子発現の正常化によるのかは不明である。本研究では時計遺伝子および体熱産生に着目し、摂食時間制限による肥満の予防メカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。
＜方法＞【実験①】BMAL1 遺伝子欠損マウス (KO), 野生型マウス (WT)に暗期 8 時間の摂食時間制限を行い、RER および活動量を測定した。【実験②】野生型マウス (C57BL/6J)に高脂肪食を自由に摂食させる群と、暗期 8 時間のみに摂食時間を制限する摂食時間制限群に分けて 1 週間予備飼育後、ZT0, 4, 8, 12, 16, 20 に炭酸ガスで安楽死させ、各種臓器を回収した。肝臓における時計遺伝子および脂質代謝関連遺伝子、鼠蹊部脂肪組織および褐色脂肪組織における体熱産生関連遺伝子の発現を real-time PCR より測定した。
＜結果＞【実験①】摂食時間制限マウスの RER は、BMAL1 KO マウスと WT マウス共に、明期に脂質、暗期に糖質をエネルギー源とする日周リズムを形成した。BMAL1 KO マウスは、WT マウスと比較して、活動の日周リズムが大きく変化した。【実験②】Cpt-1 mRNA 発現は、群間で差はなかったが、Fas, Scd1, Srebp1c mRNA 発現は、自由摂食群と比較して、摂食時間制限群において有意に減少した。Bmal1, Clock, Per1, Per2, Cry1, Cry2, Rev-erbα, Rev-erbβ mRNA 発現および Ucp1, Cidea, Dio2, PGC1α mRNA 発現は群間で差はなかった。
＜結語＞摂食時間制限は、脂質合成を抑制することで肥満を抑制する可能性が明らかになった。また、摂食時間制限は、時計遺伝子発現および体熱産生関連因子には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Time restricted feeding, Bmal1, Lipid metabolism

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A23a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A23 会場

TRPA1 アゴニストであるシンナムアルデヒド胃内投与による体温変化の作用機序の解析

Mechanisms of changes in body temperature by intragastric administration of cinnamaldehyde as TRPA1 agonist

○森 紀之、浦田 朋実、福渡 努（滋賀県大人間文化）
○Noriyuki MORI, Tomomi URATA, Tsutomu FUKUWATARI (Univ. of Shiga Pref.)

【背景と目的】 Transient Receptor Potential（TRP）チャネルは非選択性陽イオンチャネルであり、さまざまな生理的役割を有することが報告されている。TRP チャネルの一員である TRPA1 は 17℃以下の低温刺激により活性化し、興味深いことにアリルイソチオシアネートやシンナムアルデヒドなどの食品成分によっても活性化することが明らかになっている。TRPA1 は感覚神経終末などに発現し、冷痛覚への応答に関与することが報告されている。当研究室ではこれまで、TRPA1 アゴニストであるシンナムアルデヒドの胃内投与がマウスにおいて TRPA1 の活性化温度域に応じた体温調節反応を惹起することを明らかにしてきたが、その詳細な作用機序は不明であった。TRPA1 は迷走神経節にも発現することが報告されており、これまでの検討で、迷走神経節に発現が確認されている TRPM8（25℃以下の低温刺激に応答する TRP チャネルの一員）のアゴニストの胃内投与による体温変化に、迷走神経が関与することが明らかになっていることから、TRPA1 においても同様に、迷走神経系が体温調節反応に寄与している可能性が考えられた。そこで本研究は、シンナムアルデヒド胃内投与による体温調節反応への迷走神経系の関与について明らかにすることを目的とした。
【方法】 実験動物には C57BL/6J マウス♂、7 週齢を用いた。マウスを 2 時間絶食させた後、ウレタン（1.4g/kg）で麻酔した。熱産生、熱放散、深部体温の指標として肩甲骨間褐色脂肪組織周囲（IBAT）、尻尾の皮膚血管周囲、直腸の 3 カ所の体温変化をそれぞれ測定し、体温調節反応を評価した。マウスを恒温槽に入れ体温を安定させた後、カニューレを用いて胃内に試料投与し、投与後 180 分間の各部位の温度変化を測定した。投与試料にはシナモンの香気成分、シンナムアルデヒド（20 mg/kg）を用いた。迷走神経の関与を検討するため、横隔膜直下で迷走神経切除を行ったマウスを実験に用いた。
【結果と考察】 シンナムアルデヒドの胃内投与により、偽手術処置マウスにおいて IBAT 温、直腸温が上昇した。迷走神経切除マウスにおいても、シンナムアルデヒドの胃内投与により、IBAT 温、直腸温が上昇した。以上の結果から、シンナムアルデヒドの胃内投与による体温調節反応の惹起には、迷走神経の寄与は小さいことが考えられた。シンナムアルデヒドは静脈投与により IBAT 温、直腸温を上昇させることから、シンナムアルデヒドは吸収後にも作用点を有することが考えられ、シンナムアルデヒド胃内投与による体温変化には、感覚神経終末に発現する TRPA1 が体温調節反応に寄与する可能性が考えられる。現在、観察されたシンナムアルデヒドによる体温変化が、TRPA1 を介した反応であるか明らかにするため、TRPA1 ノックアウトマウスを用いた解析を進めている。

cinnamaldehyde, thermoregulation, vagus nerve

講演番号：2A23a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A23 会場

Sod1 ノックアウトマウスにおける腸内細菌叢と代謝産物の変化

Changes in intestinal bacterial flora and metabolites in *Sod1* knockout mouse

○鷺 陽香[1]、戸田 年彦[2]、小澤 裕介[2]、中西 裕美子[3]、大野 博司[3]、宮本 浩邦[3,4]、児玉 浩明[4]、清水 孝彦[2]（[1]千葉大・園芸、[2]千葉大院・医、[3]理研・IMS、[4]千葉大院・園芸）
○Haruka SAGI[1], Toshihiko TODA[2], Yusuke OZAWA[2], Yumiko NAKANISHI[3], Hiroshi OHNO[3], Hirokuni MIYAMOTO[3,4], Hiroaki KODAMA[4], Takahiko SHIMIZU[2] ([1]Fac.Horticul., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Med., Chiba Univ., [3]RIKEN IMS, [4]Grad.Sch.Horticul., Chiba Univ.)

【背景と目的】細胞質に分布する Superoxide dismutase (SOD) 1 は細胞質のスーパーオキシドアニオン (O_2^-) から過酸化水素（H_2O_2）と酸素（O_2）への変換を触媒する酸化還元酵素であり、活性酸素による酸化ストレスから細胞を守る働きをしている。*Sod1* ノックアウトマウスでは、筋肉の萎縮や骨粗鬆症、皮膚萎縮、脂肪肝など老化に伴う各種疾患を全身性に、早期に発症することから、老化モデルマウスとして活性酸素が及ぼす種々の影響について調べられている。今回は、*Sod1* の欠損に伴う腸内細菌叢の変化と、盲腸糞、肝臓、腓腹筋における代謝産物の変化について調べた。

【方法と結果】対照区（*Sod1*$^{+/+}$）、試験区（*Sod1*$^{-/-}$）ともに 15 週齢のマウスより盲腸糞、肝臓、腓腹筋を採取し、次世代シークエンスを用いて盲腸糞中の菌叢の解析、および GC-MS を用いて盲腸糞、肝臓、腓腹筋のメタボローム解析を行った。試験は 1 回目 n=7、2 回目 n=9 の 2 回行い、有意差があるもので同一傾向のものを選出した。その結果、試験区でデスルホビブリオ感染症の原因となる *Bilophila* 属が減少していた一方、*Paraprevotella* 属と *Ruminococcus* 属の増加が見られた。*Paraprevotella* 属と *Ruminococcus* 属はともに食物繊維や難消化性でんぷんを分解する菌であり、糖質の吸収や脂肪の蓄積を促進させる。そのためこれらの菌を多く保有していると肥満になると言われており、*Sod1* ノックアウトマウスにおける肝臓への脂肪蓄積は、これらの菌の増加と相関関係があると考えられた。またメタボローム解析の結果、肝臓での serine、盲腸糞での lysine の有意な減少が見られた。serine の減少は、細胞毒性の高い deoxysphingolipid や脂肪の蓄積を誘導することが報告されている。また、lysine 濃度の低い飼料の給与も脂肪の蓄積に関与しうることから、これらの分子の挙動も *Sod1* ノックアウトマウスで見られる脂肪肝との相関関係があると推察された。また、肝臓において、傷の回復促進作用のある allantoin の有意な減少が見られたことより、尿酸の代謝経路にも影響を及ぼし、創傷治癒の機能が低下していると考えられた。今回の結果では、*Sod1* のノックアウトにより腸内細菌叢が影響を受けるとともに、肝臓や腓腹筋での様々な代謝機能が影響を受けることで正常なバランスを保てなくなり、その結果、当該老化モデルマウスで観察される各種疾患へ繋がっていることが示唆された。

sod1, bacterial flora, metabolome

講演番号：2A23a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A23 会場

蛍光胆汁酸を利用した新規膵管可視化法の開発

Visualization of mouse pancreatic ducts with fluorescent bile acid

○中嶋 ちえみ[1]、神元 健児[2]、美谷島 克宏[3]、山根 拓実[3]、大石 祐一[3]、岩槻 健[3] ([1]東農大院農、[2]ワシントン大医、[3]東農大応生)
○Chiemi NAKAJIMA[1], Kenji KAMIMOTO[2], Katsuhiro MIYAJIMA[3], Takumi YAMANE[3], Yuichi OISHI[3], Ken IWATSUKI[3] ([1]Graduate school of Tokyo Univ. Agri., [2]Washington Univ. in St Louis, [3]Tokyo Univ. Agri.)

【背景・目的】
国民病とも言われる糖尿病は毎年増加傾向にあり、医療費の財政圧迫の原因の一つとなっている。糖尿病の根本的治療法の確立に向け、ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞からβ細胞の作出が試みられているが、費用、効率、機能など全てを満足させるものは存在しない。近年、内胚葉由来幹細胞の三次元培養系（オルガノイド培養系；Sato *et al*. Nature, 2009）が開発され、これまで困難だった内胚葉の幹細胞を増殖・分化させることが可能となった。注目すべきは、同方法を用いることで結紮した膵管から膵幹細胞を誘導し、膵臓の幹細胞および前駆細胞が維持できることである（Huch *et al*. EMBO J, 2013）。我々は上記を再現すべく膵管結紮とその後の幹細胞誘導を試みた。しかし、膵管は実体顕微鏡下においてさえ確認できず、結紮すべき部位の特定は不可能であった。そこで本研究では、新規の簡便な膵管可視化法を開発することを目的とした。
【方法・結果】
膵管は十二指腸へつながる胆管から分枝している。まず膵管の走行を把握するため、マウスを安楽殺後、十二指腸から胆管へとインクを逆行的に注入した。注入したインクは、胆管を経て膵管末端まで流入し、膵管の走行状態を確認することができた。次に、胆汁酸を選択的に染め分ける蛍光試薬 Cholyl-lysyl-fluorescein (CLF) により膵管も同時に可視化しようと試みた。麻酔下において CLF を尾静脈注射後、実体顕微鏡下にて観察したところ、全身を循環した CLF は胆管を通り十二指腸を経て一部膵管へと流入し、インク注入実験と同様に膵頭部、膵尾部の膵管が可視化された。そこで、同条件下で膵管結紮を試み、7 日後に膵臓の状態を確認した。その結果、膵頭部、膵尾部いずれを結紮した場合でも膵臓の自己消化による腺房細胞の死滅が確認された。免疫組織化学染色にて CK19 の発現の増殖を認め、膵管の再生が確認できた。つまり、膵管を一時的に蛍光標識し、膵管結紮を容易にすることに成功した。
【まとめ】
今回我々は、世界に先駆けて簡便な新規膵管可視化法を確立した。膵管結紮は、膵臓再生のメカニズムの解明に寄与できる可能性が高い。本方法を利用することで創薬や再生医療への応用が期待される。

pancreas, duct, visualization

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2A23a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A23 会場

アミノ酸が肝臓のインスリン様成長因子-I 遺伝子発現に及ぼす影響の解析

Effects of Amino Acids on Hepatic Gene Expression of Insulin-like Growth Factor-I

○長田 悠加[1]、山中 大介[1]、西 宏起[1]、合田 祐貴[1]、熊野 未佳子[1]、豊島 由香[2]、竹中 麻子[3]、片岡 直行[1]、伯野 史彦[1]、高橋 伸一郎[1] ([1]東大院農生科、[2]日医大先端医学研究所、[3]明大農)
○Haruka NAGATA[1], Daisuke YAMANAKA[1], Hiroki NISHI[1], Yuuki GOUDA[1], Mikako KUMANO[1], Yuka TOYOSHIMA[2], Asako TAKENAKA[3], Naoyuki KATAOKA[1], Fumihiko HAKUNO[1], Shin-Ichiro TAKAHASHI[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Nippon Medical School, [3]Meiji University)

インスリン様成長因子（IGF）は、多くの培養細胞の増殖・分化を誘導、細胞死を抑制し、動物の成長・発達に必須な同化ホルモンである。IGF-I の合成・分泌は、成長ホルモン（GH）によって促進され、タンパク質栄養状態によって調節されていることが知られている。これまでに我々は、タンパク質の量が不足した餌または質が低下した餌（栄養価の低下した餌）をラットに給餌すると、肝臓での IGF-I mRNA の発現量が低下、さらに IGF-I をクリアランスする IGF 結合タンパク質 IGFBP （IGF binding protein）-1 の mRNA 発現量及び産生が増加し、その結果血中 IGF-I 濃度が低下し、成長遅滞が起こることを明らかにしてきた。本研究では、肝細胞においてアミノ酸が IGF-I mRNA の発現量に及ぼす影響を検討した。

IGF 産生の主組織である肝臓由来の培養細胞を用いて、IGF-I mRNA 量の発現量を real time PCR で測定した。ラット肝癌細胞 Fao を、アミノ酸を十分に含む対照（Full）培地またはアミノ酸を全く含まない（Zero）培地で 24 時間培養したところ、Zero 培地での培養で発現量が顕著に減少し、細胞外のアミノ酸より細胞自律的に IGF-I mRNA の発現量が制御されることがわかった。次に GH が IGF-I 産生に及ぼす影響を調べるため、Full 培地または Zero 培地に GH を添加し、IGF-I mRNA の発現量を測定した。その結果、Full 培地では GH 添加により発現量が増加した一方で、Zero 培地では GH 添加による発現量の増加が認められなかった。このことは、細胞外のアミノ酸の存在が、GH による IGF-I mRNA 量の増加に必要であることを示している。次に、IGF-I mRNA 量の発現制御に重要な役割を果たしているアミノ酸の同定を目的に、Full 培地からそれぞれ一種類のアミノ酸だけを欠乏させた培地で 24 時間培養し、IGF-I mRNA の発現量を測定した。その結果、必須アミノ酸が一種類でも欠乏すると、IGF-I mRNA 量が顕著に減少し、IGF-I mRNA の発現には、培地中に必須アミノ酸がすべて存在する必要があることが明らかになった。さらに、Zero 培地で 9 時間培養した後、培地交換をせずすべてのアミノ酸を Full 培地のレベルまで添加、15 時間培養したところ、アミノ酸の添加によって IGF-I mRNA の発現が回復した。この結果は、細胞外のアミノ酸がシグナルとなって IGF-I mRNA 量発現を増加させることを示している。以上の結果より、肝臓には細胞外のアミノ酸をモニターする機構が存在し、特に九種類の必須アミノ酸の有無が IGF-I の mRNA の発現を制御している、すなわち、必須アミノ酸が直接シグナルとなって IGF-I 産生を制御する機構の存在が示唆された。

amino acid, insulin-like growth factor-I, gene expression

講演番号：2A23a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A23 会場

肝臓の脂質代謝における Iah1 遺伝子の作用：肝臓特異的 Iah1 欠損マウスを用いて
Effect of Iah1 gene on lipid metabolism in liver: Using liver specific Iah1 deficient mice
○金森 深作[1]、小林 美里[1]、鈴木 京[1]、舛屋 智美[1]、大野 民生[2]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1]([1]名大生命農、[2]名大医学)
○Shinsaku KANAMORI[1], Misato KOBAYASHI[1], Miyako SUZUKI[1], Tomomi MASUYA[1], Tamio OHNO[2], Atsushi MURAI[1], Humihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ.Med)

[背景・目的]

脂肪肝は生活習慣病と密接に関わる疾患である。我々は SMXA リコンビナント・インブレッドの 1 系統である SMXA5 マウスが高脂肪食誘導性の 2 型糖尿病と脂肪肝に感受性であることを見出し、その責任遺伝子の探索を進めてきた。今までに QTL 解析により、第 12 番染色体上に高い LOD スコアを示す脂肪肝遺伝子座を検出し、その領域に存在する *Iah1* を脂肪肝感受性の候補遺伝子として選抜している（*J Lipid Res*, 48:2039,2007）。短い炭素数からなるエステルに対してエステラーゼ活性を示す *Iah1* は、マウスの肝臓のみならず腎臓、肝臓、小腸、肺、脂肪組織等の広範囲に発現している（*BMC Genetics*, 17:145,2016）。これらを踏まえて、本研究では肝臓特異的な *Iah1* ノックアウトマウスを作出して、肝臓脂質代謝における *Iah1* の作用を解析した。

[方法]

Iah1 遺伝子内に loxP 配列を持つ C57BL/6N マウスと、アルブミンプロモーター下で Cre を発現するマウスとの交配により肝臓特異的に *Iah1* を欠損させたマウス(LKO)を作製した。6 週齢雄性の野生型マウス（WT）と LKO マウスを高脂肪食で 9 週間および 12 週間飼育し、4 時間の絶食後に採血および解剖を行った。血中脂質濃度、肝臓脂質含量、肝臓での脂質代謝関連遺伝子の発現レベルの測定を行い、その表現型を全身性 *Iah1* 欠損マウスと比較した。

[結果・考察]

作製した LKO マウスにおいて、*Iah1* の mRNA およびタンパク質が肝臓でのみ欠損していることを確認した。高脂肪食摂取の 12 週間後の解剖時の肝臓重量は LKO マウスで高値を示したが、肝臓総脂質含量、肝臓トリグリセリド含量に両群で有意な差は見られなかった。一方で肝臓コレステロール含量は WT に比べて LKO で有意に高値を示し、血中コレステロール濃度も LKO で有意に上昇した。このことから、肝臓における *Iah1* 遺伝子はコレステロール代謝に寄与していると考えられた。また、肝臓トリグリセリド含量の増加が見られる全身性の *Iah1* 欠損マウスでは、精巣上体脂肪での脂質代謝関連遺伝子の変化がみられたが、この変化は LKO マウスでは見られなかった。これらのことから、肝臓トリグリセリド蓄積の制御には、肝臓以外の組織における *Iah1* の作用が関与していると示唆された。

fatty liver, cholesterol, lipid metabolism

発表責任者：小林　美里（misatok@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A23a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A23 会場

Nrf1 欠失マウス肝において非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を誘導する代謝経路の探索

Identification of the metabolic pathways on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in liver-specific Nrf1 deficient mouse model

○谷内 めぐみ、井口 瑶子、辻田 忠志（佐賀大農）
○Megumi TANIUCHI, Yoko IGUCHI, Tadayuki TSUJITA (Saga Univ.)

生体恒常性は、日々の食餌に含有される刺激物質や細胞外の環境変動を感知し、適切な量の防御応答タンパク質を誘導発現することで維持されている。我々は各種ストレス物質を感知し、防御に関与する CNC-bZip 転写因子群に着目して研究を進めている。CNC-bZip 転写因子群には NF-E2 p45、Nrf1、Nrf2、Nrf3、Bach1、Bach2 が属しており、特に Nrf2 は酸化ストレス応答に重要な役割を果たすことで注目されている。このうち Nrf1 を全身で欠失させたマウスは唯一発生後期に致死となるため、生体において重要な役割を持つとされているがいまだ不明な点が多く、我々は誘導物質や調節分子の探索を通して解明に挑んでいる。

これまでの研究で、薬剤誘導性・肝特異的 Nrf1 欠失マウスの解析から、Nrf1 欠失群のマウス肝では細胞内における主たる還元性物質であるグルタチオン量の上昇が観察されるため、酸化ストレスに対して防御的に作用すると予想された。しかし同時に、Nrf1 欠失マウス肝ではバルーニングやアポトーシスが惹起された肝細胞が顕著に増加しており、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を示した。

本研究では、なぜ Nrf1 を欠失した状態では NAFLD が誘導されるのかを解明するため、網羅的な低分子代謝物の変動解析を実施し、ポリアミン代謝経路の変動が内因性のストレスにつながる可能性を見出した。本経路に関連する代謝酵素遺伝子群の発現変動を解析した結果、Nrf1 欠失マウス肝において *Spermine oxidase*（*Smo*）の発現量が有意に増加していた。これはつまり、定常状態では *Smo* の発現が Nrf1 によって抑制されていることを示した。Smo はスペルミンからスペルミジンへの変換に関与し、スペルミジンが蓄積すると非酵素的に不飽和アルデヒドのアクロレインが産生される。アクロレイン蓄積は細胞障害に直結することが腎不全及び脳梗塞で明らかとなっており、Nrf1 欠失による肝障害も同様のメカニズムで生じている可能性が示唆された。

現在、*Smo* の過剰発現と細胞死の関係性について、また、*Smo* の発現が Nrf1 によって直接抑制制御されているのかについて、培養細胞を用いレポーター解析等で検証を進めている。加えて、Nrf1 欠失マウス肝におけるアクロレイン抱合タンパク質の検出を試み、実際に障害を受けている細胞との関連を明らかにしている。

Nrf1, NAFLD, Acrolein

発表責任者：辻田忠志（tada@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2A23a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A23 会場

エストロジェンは肝臓コリン代謝を調節する
Estrogen modulates choline metabolism in liver
○秋山 慧[1]、宮地 佑希野[2]、齊藤 亜佑美[1]、KUMRUNGSEE Thanutchaporn[2]、矢中 規之[2]([1]広島大生物生産学部、[2]広島大院生物圏)
○ Kei AKIYAMA[1], Yukino MIYACHI[2], Ayumi SAITO[1], Thanutchaporn KUMRUNGSEE[2], Noriyuki YANAKA[2] ([1]Faculty of Applied Biological Sci. Hiroshima Univ., [2]Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【背景・目的】女性の閉経前後においては性ホルモンの血中濃度の変化に基づく栄養素の代謝変動が想定され、閉経後の血中エストロジェン濃度の低下により動脈硬化や骨粗鬆症が進行することが知られている。特にエストロジェンによる脂質代謝の制御が示唆されるなど、性ホルモンによる栄養素の代謝への影響は性差を考える上でも極めて重要である。一方、choline は全ての細胞機能に必要な栄養素であるが、疫学的調査により choline 摂取量は推奨摂取量に達しておらず、特に妊娠中の母体の choline 摂取量不足は新生児の認知機能低下を引き起こすことが報告されており、母体栄養の観点からも choline の重要性が考えられている。当研究室では母体の choline 摂取量不足は新生児の肝臓中 choline 化合物の低下を誘導し、肝臓の遺伝子発現においては性差を見出している。しかしながら、閉経前後における choline 代謝機構の変動については未だ不明であることから、本研究では雌性マウスの卵巣摘出の choline 代謝に与える影響を解明することを目的とした。
【方法・結果】7 週齢雌性 ICR マウスの卵巣を摘出した卵巣摘除（OVX）マウス群と偽手術を施した sham マウス群を作製し、正常食、あるいは choline 欠乏食を 8 週間与えた。OVX 群において内臓脂肪組織重量が増加しており、血中脂質は増加傾向、および血中総コレステロール濃度が増加していた。肝臓および骨格筋中 choline 代謝物量を LC/MS 法を用いて解析したところ、正常食、および choline 欠乏食いずれにおいても sham 群と比較して OVX 群は肝臓中 choline 濃度が減少していた。また骨格筋では、choline 欠乏食を負荷した OVX 群において betaine 濃度の減少が見られた。さらに、血中エストロジェン濃度を測定した結果、肝臓中 choline 濃度と有意な正の相関が認められた。性周期と choline 代謝の関連性を検討するために、8 週齢の雌性 ICR マウスを用いて 6 日間尾静脈採血を行い、血中 choline 濃度を解析したところ、マウスの性周期と同様に 4～5 日での周期が観察された。この結果から、エストロジェンが血中 choline 濃度に影響を及ぼす可能性が考えられた。一方、以前エストロジェンとの関連性が示唆され、choline の de novo 合成に関与する phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase(PEMT)の遺伝子の発現は卵巣摘除では影響が認められなかった。また、ラット由来肝実質細胞に tamoxifen を添加したところ、細胞内の choline、glycerosphosphocholine、betaine は有意に増加した。
【考察】本研究では、エストロジェン濃度が低下する閉経後の choline 量低下を示唆し、choline の閉経後の女性にとっての重要性や性差を考慮した choline 供給が必要であることが示唆された。

estrogen, choline, OVX

講演番号：2A23a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A23 会場

唾液腺と唾液の性差形成に及ぼすアンドロゲンシグナリングの影響

Effects of androgen signaling on sex difference in salivary components and salivary glands development

○原田 直樹[1]、竹中 重雄[2]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Shigeo TAKENAKA[2], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】

唾液は、唾液腺腺房細胞で産生されて口腔内に分泌される。顎下腺、舌下腺、耳下腺の 3 大唾液腺のうち、顎下腺はその発達がアンドロゲンシグナリングにより正に制御されて性差を生じることからアンドロゲンの標的器官であると考えられている。しかし、他の唾液腺発達や唾液成分へのアンドロゲンシグナリングの影響に関してはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、3 大唾液腺全ての組織発達および唾液の性差とアンドロゲンシグナリングの役割について検討した。

【方法と結果】

3 大唾液腺におけるアンドロゲン受容体（AR）の mRNA の発現は、コントロールとして用いた生殖器官の精巣上体よりは低いものの、雌雄マウスともに 3 大唾液腺の全てで高いレベルであった。免疫組織化学による検討により、顎下腺では腺房細胞と導管細胞ともに AR の発現が認められた。

性成熟後の 8 週齢の C57BL/6J マウスを①雄対照群、②雄去勢群、③雄去勢+テストステロン群、④雌対照群の 4 群に分けて 20 週齢まで飼育した。3 大唾液腺のうち、去勢により顎下腺重量は雌対照群と同程度まで減少し、テストステロンの投与により重量減少が阻害された。舌下腺と耳下腺重量に群間で差はなかった。顎下腺の導管部の面積，導管細胞量は顎下腺重量と同様にテストステロンに依存して変化した。唾液に対するテストステロンの影響を検討するために、ピロカルピン刺激によって分泌された唾液タンパク質を解析した結果、唾液分泌量、唾液タンパク質量ともに群間の差はなかったが、発現の異なるタンパク質の存在を見出した。

全身性コンディショナル ARKO マウスを作製し、その同腹仔の対照群と 20 週齢まで飼育して唾液と唾液腺の変化を検討した。顎下腺重量は ARKO で去勢時と同程度まで減少した。舌下腺では群間に有意な差はなかったが、去勢と異なり耳下腺重量も ARKO マウスで有意に減少した。顎下腺の導管部の面積、導管細胞量は比体重量と同様に ARKO マウスで減少しており、腺房細胞量も ARKO 群では減少していた。去勢実験雌マウスや雄去勢マウスで観察されたものと同様の分子量に発現の異なるタンパク質が観察された。

これらの結果から、アンドロゲンは性成熟後の顎下腺の腺房細胞の発達への影響は弱いが、唾液タンパク質産生に影響することが判明した。去勢+テストステロン投与実験と ARKO 実験における顎下腺と耳下腺の発達の違いは、AR シグナルを阻害する時期や程度の違いに起因すると考えられた。

saliva, androgen, sex difference

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A23p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A23 会場

プロスタグランジン D_2 に由来する脂質メディエーターの解析
Identification of a prostaglandin D_2-derived electrophilic mediator
○犬塚 恵美[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[2] ([1]名大院・生命農、[2]東大院・農生科)
○Emi Inuzuka[1], Takahiro Shibata[1], Koji Uchida[2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

プロスタグランジン（PG）は、外界からの刺激に応答してアラキドン酸より生成される重要な脂質メディエーターである。主要な PG のひとつであるプロスタグランジン D_2 (PGD_2) は、血小板凝集抑制や睡眠の誘発、アレルギー性炎症に関与する一方で、それ自身が非酵素的な脱水を受け、様々な PG へと変換される。PGD_2 から生成される J_2 型 PG はシクロペンテノン構造を有し、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (PPARγ) のリガンドになるなど、ユニークな生理活性を有することが知られている。しかし、PGD_2 の変換経路については不明な点が多く残っており、生体内での代謝、およびその産物の生物学的意義は明らかではない。これまでに本研究では、血清アルブミンの存在下で PGD_2 から Δ^{12}-PGD_2 へと変換されるという新規の変換経路を見出してきた。そこで、*in vitro* および *in vivo* における Δ^{12}-PGD_2 の産生について、アレルギー疾患に着目して検討を行った。

【方法・結果】

アレルギー疾患において、主に肥満細胞が PGD_2 を産生すると考えられていることから、ラット肥満細胞株である RBL-2H3 細胞を用いて Δ^{12}-PGD_2 の検出を試みた。その結果、抗原/抗体刺激をした肥満細胞培養上清から Δ^{12}-PGD_2 が検出され、その産生は COX 阻害剤の添加によって完全に抑えられた。続いて、抗 Δ^{12}-PGD_2 モノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体を用いて競合アッセイを行ったところ、Δ^{12}-PGD_2 を特異的かつ高感度に認識することを確認した。次に、生体における Δ^{12}-PGD_2 の産生について検討するため、アトピー性皮膚炎（AD）に着目した。マウスに DNFB を反復塗付し、AD モデルマウスを作製した。このマウスより、皮膚および血液を採取した。皮膚切片の組織染色をしたところ、AD モデルでは皮膚が肥厚し、肥満細胞が集積していた。また血清中の IgE 量が増加していることを確認した。蛍光標識した抗 Δ^{12}-PGD_2 モノクローナル抗体を用いて皮膚切片の免疫組織染色をした結果、AD モデルの皮膚では Δ^{12}-PGD_2 が蓄積し、血清アルブミンと共局在していることが明らかとなった。また LC-MS/MS を用いて皮膚ホモジネート中の PG を定量した結果、AD モデルマウスでは Δ^{12}-PGD_2 が有意に増加していた。現在、アレルギー疾患における Δ^{12}-PGD_2 の生物学的意義について、検討を進めている。

Prostaglandin, LC-MS/MS, lipid mediator

講演番号：2A23p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A23 会場

アスコルビン酸欠乏による肝臓と腸管での炎症関連因子の発現誘導
Ascorbic acid deficiency induces hepatic and intestinal expressions of inflammation-related genes in ODS rats.
○川出 野絵、鈴木 若奈、大谷 祥也、村井 篤嗣、小林 美里、堀尾 文彦（名古屋大農）
○Noe KAWADE, Wakana SUZUKI, Shyoya OHTANI, Atsushi MURAI, Misato KOBAYASHI, Fumihiko HORIO (Nagoya Univ.)

【目的】ビタミン C であるアスコルビン酸（AsA）を生合成できない ODS ラットにおいて、AsA 欠乏時には肝臓の急性期タンパク質（ハプトグロビン（HP）、α-1 酸性糖タンパク質（AGP）、C 反応性タンパク質（CRP））などの発現が上昇する炎症様変化が起こる。また我々は、AsA 欠乏により門脈血中のエンドトキシン濃度が上昇することや回腸の杯細胞数が増加することも見出している。急性期タンパク質の発現は主に炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、TNFα により誘導される。この肝臓での炎症様変化の成因については、AsA 欠乏時には腸管でのエンドトキシン流入により産生上昇した炎症性サイトカインが門脈血を介して肝臓に作用して、急性期タンパク質の発現が上昇することが推定される。これらを検証することを目的として、AsA 欠乏時の腸管粘膜における炎症性サイトカインの発現上昇について調査した。
【方法】（実験 1）ODS ラット（6 週齢、雄）に、AsA 濃度が 0（欠乏群）、20、40 および 300（対照群）mg/kg の飼料を与える 4 群を設けて、14 日間飼育した。各群の肝臓と回腸および盲腸の粘膜を採取して分析に供した。また、門脈血を採取した。（実験 2）実験 1 の ODS ラットの欠乏群と対照群の 2 群を 14 日間飼育して、空腸、回腸の 4 部位、盲腸の合計 6 部位から粘膜を採取し、RNA を抽出して炎症性サイトカインの mRNA レベルを測定した。
【結果】（実験 1）肝臓の HP、CRP mRNA レベルは 0 および 20ppm 群では他の 2 群に比べて高値を示した。回腸と盲腸では AsA 0 および 20ppm 群において、IL-1β mRNA レベルが対照群よりも上昇あるいは上昇傾向を示した。回腸では IL-6 mRNA レベルも 0 および 20ppm 群で対照群に比べて上昇傾向が見られた。また、門脈血中の IL-6 濃度も欠乏群で対照群に対して上昇傾向が見られた。（実験 2）AsA 欠乏群において、回腸の下部と空腸とで IL-1β と IL-6 の mRNA レベルが対照群よりも上昇あるいは上昇傾向を示した。また、盲腸でも IL-1β mRNA レベルは欠乏群で上昇が見られた。
【結論】AsA 欠乏により回腸の下部と盲腸、空腸において IL-1β および IL-6 の mRNA レベルが上昇することが明らかとなり、腸管粘膜でのこれらの産生が上昇することが示唆された。そして門脈血中 IL-6 濃度も上昇傾向が見られた。これらの結果は、AsA 欠乏時には腸管粘膜由来の IL-1β や IL-6 などの炎症性サイトカインが門脈血を介して肝臓に作用し、急性期タンパク質の発現を誘導する可能性を支持するものである。

ascorbic acid, inflammation, cytokine

講演番号：2A23p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A23 会場

Class A CpG オリゴ DNA による播種性血管内凝固症候群の改善効果

Class A CpG oligodeoxynucleotide ameliorates disseminated intravascular coagulation

○山本 祥也[1,2]、荻田 佑[3]、下里 剛士[4]([1]信州大院・総合工、[2]学振（DC2）、[3]信州大・バイオメディカル研、[4]信州大・菌類微生物セ)
○Yoshinari YAMAMOTO[1,2], Tasuku OGITA[3], Takeshi SHIMOSATO[4] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]JSPS, [3]IBS., Shinshu Univ., [4]CFMD., Shinshu Univ.)

【背景】CpG オリゴ DNA（CpG-ODN）は、感染症・アレルギー・ガンおよび炎症性疾患など、疾病の予防や軽減効果が期待される機能性核酸素材である。CpG-ODN は、シトシン（C）とグアニン（G）の連続配列を有し、その側鎖の塩基を含めた組み合わせにより A, B, C の 3 つの Class に分類され、多彩な免疫効果を発揮することが知られている。我々の研究グループは、ODN による敗血症の制御を目指し、炎症応答および血液凝固を誘導する血小板活性化因子（PAF）やその分解酵素である PAF-Acetylhydrolase（PAF-AH）に注目した。本研究では、強い PAF-AH 活性の誘導が認められる Class A CpG-ODN [1]を用いて、PAF により誘導される敗血症症状の一つである播種性血管内凝固症候群（DIC）に対する改善効果について、動物試験により検証した。
【方法】ICR（8 週齢, ♂）マウスに、致死量の PAF を腹腔内投与（i.p.）することで、DIC に伴う致死性ショックを誘導した。ショック反応誘導後 60 分まで、生存率を測定した。同マウスを用いて、PAF 投与の 1、3 および 5 日前に、50、100 および 300μg/mouse で Class A CpG-ODN1585（CpG-A1585）を i.p.した。同時に、PAF-AH の阻害剤である Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate（MAFP）を CpG-A1585 投与前にマウスに 1mg/kg で i.p.し、同様の実験を行った。また、一部のマウスはショック反応誘導後 10 分で安楽死させ、心臓から回収できる最大量の血液を回収し、血清を調製した。血清中の PAF-AH 活性について、PAF AH Assay Kit を用いて測定した。また腎臓を摘出後、パラフィン切片を作成し、HE 染色および PTAH 染色を行い、フィブリンの蓄積割合について解析した。
【結果】300μg/mouse の CpG-A1585 前投与により、PAF 誘導性ショックによる生存率が向上し、その作用効果は、MAFP の投与により阻害された。また CpG-A1585 は、PAF により誘導される血液凝固を改善し、血清中の PAF-AH 活性を有意に増加させた。PAF の投与では、小葉間静脈から腎小体にかけてフィブリンやフィブリン血栓が認められたが、CpG-A1585 の投与では有意に減少した。
【考察】PAF は、敗血症および DIC の発症過程において中心的な役割を果たすこと、また PAF-AH は、敗血症を改善することが報告されている。本研究の結果より、CpG-A1585 の投与は、PAF 誘導性ショックを改善するとともに、凝血応答およびフィブリン形成を抑制した。すなわち、CpG-A1585 は PAF-AH を活性化することで、DIC を改善することが明らかとなった。
[1] Yamamoto *et al*., *Frontiers in Immunology*, 8, 1049, 2017.

Class A CpG-ODN, sepsis, platelet activating factor acetylhydrolase

発表責任者：下里　剛士（shimot@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A23p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A23 会場

四塩化炭素誘導肝障害からの再生過程におけるマクロファージの除去は肝代謝機能の回復を遅延させる

Macrophage depletion delays the liver regeneration after carbon tetrachloride-induced liver injury

○三浦 徳[1]、鎌倉 美和子[2]、御子柴 直樹[2]、増澤(尾﨑) 依[1,2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○Atsushi Miura[1], Miwako Kamakura[2], Naoki Mikoshiba[2], Yori Ozaki-Masuzawa[1,2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】肝臓は、毒物やウイルス感染、外科的切除によりその大部分を失っても、著しい再生能力を発揮する。マクロファージ（以下 Mφ）は、炎症シグナルの活性化や死細胞の貪食、細胞外マトリクスの分解などにより微小環境の恒常性を維持している。肝再生において、Mφはサイトカインを放出し肝実質細胞の増殖を促進する。しかし、肝再生過程の組織リモデリングにおける Mφの役割は明らかでない。本研究では、四塩化炭素誘導急性肝障害モデルマウスを用いて、肝再生過程における Mφの選択的除去が肝機能の回復や再生に及ぼす影響について検討を行った。
【方法】C57BL/6J マウス（8-12 週齢、オス）に、四塩化炭素（CCl_4, 1 mL/kg b.w.）を経口投与し、急性肝障害を惹起した。その後、四塩化炭素による急性期応答が終了し、肝細胞増殖が認められる 2 日後から、Mφの選択的な除去剤であるクロドロン酸リポソーム（以下 CLO; 100 μL/mouse）を 2 日毎に腹腔内投与した（CLO 群）。対照群にはクロドロン酸を含まないリポソームを同様に投与した（vehicle 群）。四塩化炭素投与後 9 日まで経時的に肝臓および血液を回収し、各種解析を実施した。
【結果】Mφマーカー F4/80, Cd68 ならびに貪食関連因子 Clec7a の肝臓における遺伝子発現レベルは、CLO 投与後 2 日以降（CCl_4投与 4 日後）から顕著に低値を示した。ヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析の結果、CCl_4投与 7 日以降の CLO 投与群マウスでは、中心静脈域における組織損傷回復に著しい遅延が認められた。また、観察された組織像の変化と一致して、肝損傷のマーカーである血漿 ALT, AST 活性は CLO 投与により高値を維持した。一方、細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen タンパク質ならびに cyclin D1, cdk1 遺伝子の発現レベルに、CLO 投与の影響は認められなかった。さらに、肝機能の回復を評価するために、GC/MS を用いたメタボローム解析を行った。Vehicle 群と比較して、CLO 群ではキサンチンやヒポキサンチン、グルコースやガラクトースといった糖・核酸代謝に関連する代謝物が低下していた。
【結語】本研究では、肝再生過程において Mφは組織構造の再構築に必須であること、細胞増殖が活性化しても Mφが存在しないと肝臓の機能回復が顕著に遅延することを明らかにした。

Liver regeneration, Macrophage, Clodronate-liposome

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A23p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A23 会場

β-クリプトキサンチンによる骨格筋萎縮抑制作用について
Inhibitory effect of β-cryptoxanthin on skeletal muscle atrophy
○野中 麻由[1]、北風 智也[2]、向井 克之[3]、原田 直樹[1]、乾 博[4]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]（株）ダイセル、[4]大阪府大院・栄養)
○Mayu NONAKA[1], Tomoya KITAKAZE[2], Katsuyuki MUKAI[3], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[4], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Sci.Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Daicel Corp., [4]Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】骨格筋は体重の約 40%を占める人体最大の組織であり、運動や姿勢の維持だけでなく、糖や脂質の代謝も担う。運動不足、ベッドレスト、ギブス固定などの長期にわたる不活動により、骨格筋は萎縮（廃用性筋萎縮）する。骨格筋の萎縮は筋量や筋力を低下させ、運動機能の低下による寝たきりや代謝異常である肥満・糖尿病を誘発し、生活の質を著しく低下させる。したがって廃用性筋萎縮の予防および進行遅延に有効な食品成分を日常の食事から摂取することは重要である。β-クリプトキサンチンはヒトの血中に高濃度で存在するカロテノイドの一つであり、温州みかんに多量に含まれる。β-クリプトキサンチンは骨粗鬆症予防作用、発がん抑制作用など様々な生理活性を示すことが報告されているが、骨格筋量におよぼす影響については不明である。そこで本研究では、β-クリプトキサンチンが筋萎縮時の骨格筋におよぼす影響について検討することを目的とした。
【方法と結果】マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、β-クリプトキサンチン存在下で培養した。その後、過酸化水素を暴露させ、ウエスタンブロット法にて筋構成タンパク質である Myosin heavy chain（MyHC）と Tropomyosin の発現量を検討した結果、過酸化水素による MyHC と Tropomyosin の発現レベルの低下がβ-クリプトキサンチンによって抑制された。8 週齢の雄性 ddY マウスにβ-クリプトキサンチン（0.5 mg/日）を経口投与し、2 週間後に尾部を懸垂し、後肢を不活動状態にした。β-クリプトキサンチンの投与は尾部懸垂終了時まで実施した。尾部懸垂 0、7、14 日目に筋重量を測定した結果、コントロール群では 7 日目において 0 日目に比べてヒラメ筋重量が有意に低値を示したが、β-クリプトキサンチン投与群では 7 日目において 0 日目に比べてヒラメ筋重量に有意な差は認められなかった。14 日目においてはコントロール群、β-クリプトキサンチン投与群ともに 0 日目に比べてヒラメ筋重量は有意に低値を示した。よってβ-クリプトキサンチンは早期の筋萎縮に対して抑制効果をもつことが示された。そこで萎縮の抑制が見られた 7 日目のヒラメ筋において筋萎縮関連因子（Atrogin-1、MuRF1）の発現レベルを定量的 RT-PCR 法を用いて検討したところ、β-クリプトキサンチンは Atrogin-1 の発現レベルの上昇を抑制することが明らかになった。さらに酸化ストレスによって増加するカルボニル化タンパク質について 7､14 日目のヒラメ筋を用いて検討したところ、14 日目のβ-クリプトキサンチン投与群において減少傾向が見られた。以上の結果から、β-クリプトキサンチンは不活動により誘発された筋萎縮関連因子 Atrogin-1 の発現上昇を阻害することで初期の段階での筋萎縮を抑制することが示唆された。

Skeletal muscle, Muscle atrophy, β-Cryptoxanthin

講演番号：2A23p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A23 会場

胆汁酸受容体 TGR5 は骨格筋を肥大化し筋力の増大を誘導する

Bile acid receptor TGR5 induces muscle hypertrophy and increases muscle strength

○佐々木 崇、久保山 文音、村田 翔太朗、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi SASAKI, Ayane KUBOYAMA, Shotaro MURATA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】肝臓で合成された胆汁酸は摂食に応じて消化管に分泌され、脂溶性の食品成分やビタミン類の消化吸収を助けるばかりでなく、それ自体がシグナル分子として働くことで様々な代謝変動を引き起こすことが知られている。特に血中胆汁酸濃度は食後に大きく上昇することから、摂食シグナルを伝達する因子と考えられる。胆汁酸受容体 TGR5 は様々な組織に発現が認められ、その活性化により抗肥満効果や糖代謝改善効果を発揮する。これらの作用は褐色脂肪組織における熱産生亢進や小腸における GLP-1 分泌亢進などにより説明されているが、TGR5 の機能に関する理解は未だ限定的である。特に、骨格筋は摂食に応じて最もダイナミックな代謝変動を生じる臓器のひとつであるにも関わらず、胆汁酸シグナルが骨格筋機能に及ぼす影響は明らかにされていなかった。そこで本研究では、TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響の解明を試みた。

【方法と結果】全身性 TGR5 ノックアウトマウスおよび骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニック（Tg）マウスを用い TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響を解析したところ、TGR5 が骨格筋の肥大化、ならびに筋力の増大を誘導することが明らかとなった。Tg マウスは同腹仔の野生型マウスと比較して骨格筋重量が 10%程度増加しており、さらに若齢期から高齢期に至るまで有意な筋力の増大が確認された。Tg マウス骨格筋への胆汁酸投与により、骨格筋の成長を促進する IGF1 の発現上昇や筋萎縮関連遺伝子の発現低下が確認され、これらが TGR5 による筋量増大効果の一部を説明するものと考えられた。またヒト初代培養骨格筋細胞においても、TGR5 活性化により同様の遺伝子発現変動を示した。続いて我々は骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析を行った。興味深いことに、TGR5 mRNA 発現量は運動後のマウス骨格筋で転写因子 ATF6α依存的に上昇することが示された。

【考察】遺伝子改変マウスを用いた一連の実験より、胆汁酸受容体 TGR5 が新たな筋肥大誘導因子であることが示され、更に TGR5 発現量は運動後の骨格筋で上昇することが明らかとなった。これらの結果は、TGR5 を軸とし、運動と摂食が相乗的に筋肥大を誘導するシステムの存在を示唆している。超高齢社会を迎えた我が国では、加齢に伴う筋量の低下（サルコペニア）が深刻な問題となっており、高齢者の QOL 低下や医療費の増大を招いている。本研究結果より、骨格筋 TGR5 が新たな筋機能改善ターゲット分子として、これらの問題解決に貢献する可能性が示された。

bile acid, skeletal muscle, tgr5

講演番号：2A23p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A23 会場

ATF6αおよび Ca^{2+}シグナルによる Tmem100 発現制御機構

Study on regulatory mechanism of Tmem100 gene expression by ATF6α and Ca^{2+} signaling

○久保山 文音、佐々木 崇、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Ayane KUBOYAMA, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】G タンパク質共役受容体 TGR5 は胆汁酸をリガンドとし、糖代謝改善効果や抗肥満効果を発揮する。我々はこれまで骨格筋 TGR5 の機能解析に取り組み新たに筋肥大効果を明らかにしてきたが、その過程で骨格筋 Tmem100 遺伝子の発現が TGR5 ノックアウトマウスで低下し、TGR5 トランスジェニックマウスで上昇していることを発見した。Tmem100 は 134 アミノ酸で構成される 2 回膜貫通型タンパク質であり、脊椎動物種間で高度に保存されている。骨格筋や脳、肺など幅広い組織に発現し、近年は血管の分化・形態形成や神経細胞における痛覚の伝達に不可欠な因子として注目されている。また、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスマーカーとしての有用性も見出されているが、その発現制御の詳細は解明されていない。そこで本研究では、Tmem100 が生体内で様々な機能を担う重要な遺伝子であることを鑑み、Tmem100 の新規発現調節機構の検討を行った。

【方法と結果】ルシフェラーゼ遺伝子上流にマウス Tmem100 プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用いて小胞体ストレス応答性転写因子による制御を網羅的に解析した結果、活性型 ATF6α が 2 か所の ERSE（endoplasmic reticulum stress response element）様配列を介して Tmem100 の発現を調節することが示された。しかし、小胞体ストレス誘導剤のうち、Ca^{2+} ATPase を阻害し小胞体内 Ca^{2+}を枯渇させるサプシガルジンでは Tmem100 の発現が上昇したのに対し、糖鎖修飾酵素を阻害するツニカマイシンでは変化しないことが明らかとなった。さらに、細胞外から細胞内へ Ca^{2+}を流入させるイオノマイシンの投与時にも Tmem100 の転写活性や mRNA レベルが上昇し、サプシガルジン、イオノマイシンによる効果はキレート剤 EGTA によって打ち消された。

【考察】レポーターアッセイの結果、当初はサプシガルジンによる Tmem100 の発現亢進が ATF6α 特異的な小胞体ストレス応答経路で生じると考えられたが、その後の検討により生理的条件下では Ca^{2+}シグナルのほうが重要であることが示唆された。今回調べた経路は、骨格筋における Tmem100 と TGR5 の関係を直接結びつけるものではないが、Ca^{2+}シグナルも筋肥大に寄与することが報告されているため、Tmem100 が何らかの形で筋肥大に関わる可能性が想定される。本研究で得られた知見をもとに Tmem100 の機能解析を進めることで、TGR5 や Ca^{2+}シグナルとのつながり、ひいては骨格筋の肥大化に至る新たな分子メカニズムの解明が期待される。

Tmem100, ATF6α, Ca^{2+} signaling

発表責任者：佐藤隆一郎（aroysato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A23p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A23 会場

骨格筋萎縮時に発現誘導される Ankrd1 の機能解析

A functional analysis of Ankrd1 induced expression in skeletal muscle atrophy.

○吉田 壮志[1]、橋詰 力[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]静県大・栄養生命科)
○ Soshi YOSHIDA[1], Tsutomu HASHIDUME[2], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. Shizuoka)

【目的・背景】

骨格筋の萎縮は運動器機能障害や転倒骨折の遠因とされており、ADL（日常生活動作）や QOL の低減に直結している。2013 年に高齢化率 25%を超え、今後更なる高齢者の増加が予測される我が国において、健康寿命の延伸は喫緊の課題であり、こうした筋萎縮症状に起因する社会的影響は看過できない。一方で筋萎縮は廃用性、神経性、高齢性など様々な原因が指摘されているものの、その詳細なメカニズムに関して十分な解明が為されたとは言い難く、その基礎的知見の構築は筋萎縮予防法の確立に重要である。本研究は筋萎縮時に共通して発現が誘導される遺伝子の探索と機能解析に主眼を置いている。筋萎縮モデルマウス腓腹筋における DNA マイクロアレイの結果、筋萎縮における機能不明な Ankyrin repeat domain 1（Ankrd1）が見出されたため、その機能解析結果と共に報告する。

【方法・結果】

廃用性筋萎縮のモデルであるギプス固定マウス腓腹筋の DNA マイクロアレイ解析により、筋萎縮において発現の増大する遺伝子を網羅的に解析した。その結果除神経マウス腓腹筋で発現の増大が報告されている Ankrd1 の発現誘導が見出された。続いて除神経、ギプス固定マウス腓腹筋における Ankrd1 の mRNA 及びタンパク質レベルの発現を QPCR 及びウエスタンブロットにより検出した所、顕著な発現上昇が確認された。Ankrd1 は主として心筋に発現している筋特異的なストレス応答性タンパク質であり、転写因子や構造タンパク質と相互作用することが報告されているが、筋萎縮に関連した機能は不明な点が多い。Ankrd1 は E3 ユビキチンリガーゼである MuRF1 と相互作用することが酵母ツーハイブリット法により示唆されている。HEK293 細胞において、MuRF1 と Ankrd1 を共発現後、プルダウンアッセイによって両者の相互作用性について検討を行った。その結果外因性 MuRF1 と外因性 Ankrd1 が相互作用することが認められた。さらなる機能検討のため、C2C12 筋管細胞において Ankrd1 のノックダウン実験を行った。その結果、Ankrd1 の発現低下によって、MuRF1 の基質である myosin light chain のタンパク質レベルの発現増加が確認された。

【結論】

本研究により、ギブス固定及び除神経による骨格筋萎縮に共通して発現上昇する遺伝子として Ankrd1 が見出された。Ankrd1 が MuRF1 と相互作用すること、Ankrd1 のノックダウンが MuRF1 基質の増加をもたらすことから、Ankrd1 は MuRF1 の活性を負に制御していることが示唆された。

Ankrd1, muscle atrophy, MuRF1

発表責任者：吉田壮志（soshi74@hotmail.co.jp）

講演番号：2A23p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A23 会場

筋萎縮時に DNA メチル化酵素 Dnmt3a の低下は筋再生を抑制する

Reduced Dnmt3a impaired skeletal muscle regeneration

○畑澤 幸乃[1]、小野 悠介[2]、広瀬 優真[1]、岡野 正樹[3]、小川 佳宏[4]、亀井 康富[1]([1]京都府立大生命環境、[2]長崎大医歯薬、[3]熊本大発生医研、[4]東京医歯大医歯)
○Yukino Hatazawa[1], Yusuke Ono[2], Yuma Hirose[1], Masaki Okano[3], Yoshihiro Ogawa[4], Yasutomi Kamei[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Nagasaki Univ., [3]Kumamoto Univ., [4]Tokyo Medical Dental Univ.)

筋萎縮による骨格筋機能低下のために寝たきりや車椅子が必要になるなど、生活の質の低下がもたらされる。超高齢社会を迎えているわが国では骨格筋機能不全の予防戦略の確立は健康寿命延伸の観点から最重要課題のひとつである。
加齢により筋量・筋力が減少するとともに筋損傷からの回復（筋再生）に時間がかかり寝たきりになりやすいことが知られる。筋損傷からの回復（再生）には筋サテライト細胞（筋幹細胞）が重要な役割を果たす。老齢などの筋萎縮時に筋サテライト細胞の機能が低下している可能性があるがその詳細は不明であった。

本研究では、筋萎縮モデルマウス（老齢、ギプス固定、神経切除）の骨格筋の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、筋萎縮時に骨格筋において DNA メチル化酵素である Dnmt3a が発現低下することを見出した。骨格筋特異的 Dnmt3a 欠損マウス（Dnmt3a KO マウス）を作製したところ、カルディオトキシン投与による筋損傷後の筋再生が低下することが判明した。Dnmt3a KO マウスの筋サテライト細胞では Dnmt3a の欠損により、TGFβ ファミリーの GDF5（Growth Differentiation Factor 5）遺伝子プロモーターの DNA メチル化が低下・発現増加が観察された。また、Dnmt3a KO の筋サテライト細胞は分化能が低下し、筋再生が抑制することが明らかとなった。これらの結果から、筋萎縮時の筋再生能低下には DNA メチル化酵素の発現低下によるエピジェネティクス制御が示唆された。(Hatazawa et al FASEB Journal. 2018)

skeletal muscle, epigenetics, DNA methylation

発表責任者：亀井康富（kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：2A23p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A23 会場

GDE5 骨格筋過剰発現マウスはストレス誘導性の sarcopenia 自然発症モデルとして有用である
GDE5 overexpression mouse in skeletal muscle is ueful as a model of stress-induced sarcopenia spontaneous onset model

○佐藤 洸司[1]、橋本 貴生[2]、梶原 香[2]、楊 波[2]、岡崎 優利[2]、和田 正信[3]、THANUTCHAPORN Kumrungsee[2]、矢中 規之[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏、[3]広島大総合科学)
○ Kouji SATOU[1], Takao HASHIMOTO[2], Kaori KAJIHARA[2], Ha YOU[2], Yuri OKAZAKI[2], Masanobu WADA[3], Kumrungsee THANUTCHAPORN[2], Noriyuki YANAKA[2] ([1]Faculty of Applied Biological Sci, Hiroshima Univ., [2]The Graduate School of Biosphere Sci, Hiroshima Univ., [3]Integrated Science,Hiroshima Univ.)

【背景・目的】骨格筋萎縮は、遺伝的な要因が解明されている病態を除いて発症の要因は多様である。特に、発症過程が極めて複雑な病態で知られる、加齢に伴う骨格筋萎縮（sarcopenia）の動物実験は長期の飼育を必要とし、短期の筋萎縮自然発症モデルの報告に乏しい。以前、我々は glycerophospho-diesterase 5 (GDE5)がエネルギー消費量の多い骨格筋組織に多く発現し、酵素活性を欠失させた変異体である GDE5dc471 がマウス筋芽細胞株 C2C12 の筋細胞分化を抑制することを見出している。そこで、GDE5dc471 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス（GDE5Tg マウス）を作出したところ、12 週齢で Type2 筋線維が豊富な骨格筋（速筋型）重量のみが低下した。この速筋優位の筋萎縮は、ヒトの sarcopenia にみられるため、GDE5Tg マウスは sarcopenia の短期、かつ自然発症モデル動物として期待し、本実験では、未解明である GDE5Tg マウスの病態生理を経時的に解析し、さらに、発症要因を探索した。
【方法・結果】骨格筋病態の進展メカニズム解析のため、4 週齢、8 週齢、1 年齢で GDE5Tg マウスの病態解析を行った。4 週齢では筋萎縮を示さなかったが、8 週齢では速筋型骨格筋に選択的な筋重量の低下と筋断面積の縮小、および運動機能の低下を示し、この形質は 1 年齢まで不可逆的に継続した。次いで、筋収縮に重要な役割をもつ neuromuscular junction (神経筋接合部, NMJ)の後シナプス膜をα-Bungarotoxin を用いて形態観察を行ったところ、GDE5Tg マウスと野生型マウスとの間に差異はなかったものの、NMJ を構成する筋特異的な nicotinic acetylcholine receptor (nAchR) subunit mRNA は、筋萎縮を示さない 4 週齢においても有意に発現上昇し、1 年齢まで持続した。一方、8 週齢、および 1 年齢の GDE5Tg マウスの腓腹筋病理像において異常なタンパク質様物質の沈着を認め、2 週齢、および 4 週齢の腓腹筋を用いた Western blot 解析では、ストレス応答に関与する HSP70 タンパク質が著しく発現上昇していた。また、2 週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いた DNA microarray 解析では、HSP70 を含む様々なストレス応答に関連した遺伝子群が発現上昇した。
【考察・結論】GDE5Tg マウスは、わずか 8 週齢で速筋型骨格筋の選択的な萎縮と運動機能の低下を示し、長期に持続したことから、sarcopenia との類似性が示唆された。また、速筋型萎縮の発症と進展において、異常タンパク質の蓄積による細胞ストレス応答が関与するというフォールディング病としての概念を示した。さらに、sarcopenia で発現上昇が知られる nAchR subunit mRNA について、NMJ の変性による代償応答とは異なる新たな発現誘導機構を呈示できる点は興味深いと考えられた。

sarcopenia, atrophy, skeletal muscle

講演番号：2A23p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A23 会場

C.elegans を用いた生活習慣病胎児期起源説のエピジェネティック解析

Epigenetic analysis of Fetal Origins of Adult Disease using *C.elegans*

○磯部 芙久子、坂上 美登理、西田 彩乃、岡田 嵯和子、下地頭所 理美、齋藤 春佳、清水 愛、森下 真有、山本 佳苗、宮前 さつき、松本 晋也（京女大家政）
○ Fukuko ISOBE, Midori SAKAGAMI, Ayano NISHIDA, Sawako OKADA, Satomi SHIMODITOSYO, Haruka SAITO, Ai SHIMIZU, Mayu MORISHITA, Kanae YAMAMOTO, Satsuki MIYAMAE, Shinya MATSUMOTO (Kyoto Women's Univ.)

生活習慣病はその名の通り食事、睡眠、運動の過不足など、不健康な生活習慣を主な原因として生じる。しかし近年、生活習慣病の病因は出生前からも既に形作られるという生活習慣病胎児期起源説（FOAD 説）が提唱されている。胎内で低栄養・過栄養状態に晒された胎児は様々な代謝関連遺伝子の発現を変化させると考えられている。その結果、成人後に生活習慣病の発症リスクが高くなるという考え方である。胎児の出生時体重は栄養状態の指標であり、低体重であるほど栄養が乏しかったと推測される。日本では若い女性のやせ（BMI<18）の割合が 20%以上の高い値で推移しており、これに伴って低出生体重児の割合も高いレベルで推移している（約 10%）ことから、FOAD 説が正しければ日本では生活習慣病発症リスクの高い世代が生じている可能性がある。

本研究室では線虫（*C. elegans*）を用いて実験を行ってきた。そのなかで「飢餓を経験した線虫から産まれた仔線虫は脂肪蓄積量が増加する」という知見を得た。この知見は線虫における FOAD 説の発動であると考えることができる。線虫はヒトと同じ多細胞生物のモデル生物として活用されており、線虫を用いて FOAD 説のメカニズムを解明できるのではないかと考えられる。

飢餓線虫から生じる仔線虫で脂肪が増加するのはエピジェネティクスが原因だと仮定し、RT-PCR による脂質代謝関連遺伝子・ヒストンメチル化関連遺伝子の発現量の定量、DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅的解析、ウエスタンブロットによるヒストン修飾解析を行った。RT-PCR による脂質代謝関連遺伝子の解析では、絶食群で脂質合成・分解遺伝子両方が給餌群と比較して約 2 倍増加した。DNA マイクロアレイでは 2849 個の遺伝子で絶食群と給餌群で発現量が異なることがわかり、絶食群では全体的に遺伝子発現量が抑制されることが示唆された。また、ウエスタンブロットによるヒストン修飾解析では H3K4me3 が絶食群で増加するなど、エピジェネティック変化が起こることが示唆された。

更にヒストンのメチル化以外の修飾、つまりアセチル化、リン酸化、SUMO 化に関連する遺伝子の発現量を RT-PCR で解析した。DNA アデニンのメチル化についても線虫を用いて解明を試みた。RT-PCR による DNA アデニンメチル化関連遺伝子発現量の変化、ドットブロットによるメチル化 DNA の検出について現在も解析中である。

C.elegans, starvation, epigenetics

講演番号：2A23p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A23 会場

繰り返し絶食を経験した C. elegans のおける脂肪蓄積量の増加

Fat accumulation in repeatedly-starved C.elegans

○松本 晋也、澤永 朱里、山本 さゆり、佐藤 奈生、長尾 美咲、山本 佳苗、山本 玲奈、岡部 祐実(京女大食物)
○Shinya MATSUMOTO, Akari SAWANAGA, Sayuri YAMAMOTO, Nao SATO, Misaki NAGAO, Kanae YAMAMOTO, Rena YAMAMOTO, Yumi OKABE (Kyoto Woman's Univ.)

健康に過ごすには規則正しい食生活が重要だとよくいわれる。しかし，深夜の食事，欠食といった不規則な生活を避けて規則正しい食生活を送ることは現代生活では必ずしも簡単ではない。不規則な食生活が我々の健康に本当に影響を及ぼすのか，及ぼすとしたらどのように影響を及ぼすのかについては未解明の部分が多い。また，ダイエットを繰り返し試みると（そして，失敗すると），ダイエット試行以前より体重が増加してしまういわゆる「リバウンド」現象に関しても，本当にそのような現象が存在するのか明確には示されていない。そこで，不規則的な食生活が生体にどのような影響を与えるのかを明らかにするため，多細胞生物のモデルである C. elegans に繰り返し絶食を施し，その影響を検討した。
十分に餌を与えて成長した C. elegans に対して，（6hr 絶食-18hr 給餌）という絶食プロトコールを導入した。このプロトコールを 2 回続けて導入することで繰り返し絶食のモデルとした。この絶食プロトコールを経験した C. elegans の脂肪蓄積量を，脂質結合性色素を用いた蛍光法と生化学的手法で解析したところ，繰り返し絶食を経験した線虫で有意に脂肪量が増加していることがわかった。また，脂肪合成関連遺伝子群と脂肪分解遺伝子群の発現を RT-PCR で解析したところ，脂肪蓄積を促す発現パターンを示していることがわかった。一方，寿命，運動能力，生殖能力については明確な影響は認められなかった。
脂肪合成遺伝子群と分解遺伝子群の発現パターンの変化にヒストンの修飾が関与しているのかを現在解析中である。

C. elegans, starvation, obese

発表責任者：松本晋也（matumots@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：2A23p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A23 会場

安定化 DHA・EPA 油摂取による β アミロイド脳室内単回投与マウスの学習障害改善作用

Stabilized DHA treatment ameliorates memory impairment induced by beta-amyloid in mice.

○市瀬 嵩志[1]、加藤 真晴[2]、入江 智子[1]、村澤 寛泰[3]、橘 伸彦[1] ([1]不二製油グループ本社株式会社未来創造研究所、[2]不二製油株式会社　油脂開発室、[3]株式会社日本バイオリサーチセンター)
○Takashi ICHINOSE[1], Masaharu KATO[2], Tomoko IRIE[1], Hiroyasu MURASAWA[3], Nobuhiko TACHIBANA[1] ([1]FUJI OIL HOLDINGS INC., [2]FUJI OIL CO., LTD., [3]Nihon Bioresearch Inc.)

背景

近年、DHA・EPA などの ω-3 系脂肪酸に関する様々な生理機能研究が活発になされ、特に認知機能に関する研究への注目度は高い（Hashimoto, *et. al.*, JARCP, 2012）。しかし DHA・EPA の摂取量は減少しており、その原因の一つとしてその酸化劣化臭が指摘されている。我々は DHA・EPA 含有油に高い抗酸化性を付与することで、劣化臭がなく汎用性が高い安定化 DHA・EPA 油（プロレア ®）を開発した。本研究では、アルツハイマー病モデルである β アミロイド（βA）脳室内単回投与マウスを用いて、安定化 DHA・EPA 油摂取が認知機能（学習能）に及ぼす効果について検討した。

方法

マウスは、雄性 Slc:ddY を用いた。群構成は、注射用水を脳室内投与し大豆油（SO）を経口投与する SO_sham 群、注射用水を脳室内投与し安定化 DHA・EPA 油を経口投与する DHA_sham 群、βA を脳室内投与し大豆油を経口投与する SO_βA 群、βA を脳室内投与し安定化 DHA・EPA 油を経口投与する DHA_βA 群の計 4 群、1 群 12 匹で設定した。被験物質（SO または安定化 DHA・EPA 油）は 1 日 1 回、16 日間反復経口投与した。8 日目に注射用水あるいは βA を脳室内に単回投与した。14 日目の被験物質投与 1 時間後に Y 迷路試験を行った。15 日目の被験物質投与 1 時間後に 1 回目の受動回避試験（獲得潜時の測定）を行い、16 日目の被験物質投与 1 時間後に 2 回目の受動回避試験（反応潜時の測定）を行った。その後、前頭前野と海馬を摘出し、分析に供するまで－80 度で保存した。

結果

Y 迷路試験で評価される自発的交替行動率（%）において、SO_βA 群は他の 3 群に対して有意に低く、SO_βA 群のみに短期記憶障害が生じていることが示唆された。受動回避試験では、獲得潜時には 4 群間に有意な差はないものの、反応潜時には SO_βA 群は SO_sham 群および DHA_sham 群に対して有意に低かった。また、DHA_βA 群は SO_βA 群に対して有意に高く、DHA_βA 群は長期記憶障害が改善されていることが示唆された。以上より、プロレア®の摂取は、βA 脳室内単回投与マウスにおける短期記憶障害および長期記憶障害を改善することが示唆された。現在、記憶と密接に関わるモノアミンの測定を進めている。

stabilized DHA, monoamine

発表責任者：市瀬 嵩志（ichinose.takashi@so.fujioil.co.jp）

講演番号：2A23p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A23 会場

中枢性疲労を軽減する食品成分の探索

Development of a determination method of central fatigue with spontaneous wheel running of rats

○志村 広樹、井上 和生（京大院農）
○Hiroki SHIMURA, Kazuo INOUE (Kyoto Univ.)

【目的】 情報化社会やコンピューター社会である現代では多くの人が疲労に悩まされている。疲労は筋収縮力の低下などに代表される末梢性の疲労と不快感や意欲の低下を引き起こす中枢性疲労（≒疲労感）に分類される。現代人は特に疲労感に悩まされているため、疲労感の軽減が生活の質の向上に重要である。手軽な疲労の軽減法の一つとして食品の応用が期待される。抗疲労効果を謳う食品は多く市販されているが、疲労感の定量的な測定が困難であることに起因して疲労感を軽減する科学的根拠が証明された食品は未だ販売されていない。そこで本研究は、疲労感を定量的に測定する系を確立し、疲労感を軽減する食品成分を探索することを目的とした。

【方法】 7 週齢の雄性 SD ラットを実験に用いた。疲労感の指標として回転カゴで自発的に運動を行う意欲の低下を測定した。ラットを 6 日間連続で 3 時間回転カゴにアクセスさせ、4 日目と 5 日目の回転数の平均値を Pre、6 日目の回転数を Post とした。6 日目に回転数を測定する前にラットに負荷を課し、Post の値が Pre に比べて有意に減少した場合に疲労感を検出できたと判断した。ラットに課す負荷として満員電車の窮屈さのようなものを想定した拘束ストレス（RS）を用いた。はじめにラットに 2 時間の RS を課し、自発運動量を指標として疲労感を検出できるかを検討した。

次に RS による疲労感の発生機構に副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）とκ-オピオイドが関与しているかを検討した。RS を課す前に CRF1 受容体のアンタゴニスト、antalarmin（10 mg/kgBW i.p.）とκ-オピオイド受容体のアンタゴニスト、 nor-BNI（10 mg/kgBW i.p.）を投与し、RS による自発運動量の減少が抑制されるかを検討した。

また、RS によるうつ症状を抑制すると報告されているシリマリン、アグマチン、プロトカテク酸エチルをラットに経口投与し、拘束ストレスによる自発運動量の減少が抑制されるかを検討した。

【結果と考察】 2 時間の RS を課すことにより、Post の値は Pre に比べて有意に減少した。RS は肉体的負荷が少ないため、運動量の低下は肉体的疲労というよりは意欲の低下≒疲労感の大きさの定量と見なせる。antalarmin 投与では Post での自発運動量の減少が抑制されなかったが、nor-BNI では抑制傾向が見られた。以上より RS による疲労感の発生にはκ-オピオイドが関与していることが示唆された。シリマリン、アグマチン、プロトカテク酸エチルの抗疲労効果についても報告する。

central fatigue, anti-fatigue food, stress

発表責任者：志村広樹（shimura.hiroki.37v@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A23p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A23 会場

SIRT1 はショ糖摂食選択行動を制御する

SIRT1 regulates sucrose diet selection behavior

○松居 翔、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘（群馬大生調研）
○ Sho MATSUI, Tsutomu SASAKI, Daisuke KOHNO, Hiromi HASHIMOTO, Masaki KOBAYASHI, Tadahiro KITAMURA (Gunma Univ.)

【背景】日本を含めた先進諸国においては、過食による生活習慣病の発症が深刻な問題となっている。食事療法は、生活習慣病の有効な治療法であるが、患者のコンプライアンスが低いことが問題となっている。その要因の一つとして、食の嗜好性がある。食成分の中で、特に糖分や脂肪分が生活習慣病の元凶であるため、糖や脂質への嗜好性メカニズムの解明をとおし、患者が遵守できる肥満の是正の新たな治療戦略が必要である。長寿遺伝子 SIRT1 は、NAD^+依存性の脱アセチル化酵素で、カロリー制限という食餌療法の健康長寿効果を担う分子の一つである。これまでに当研究室では、SIRT1 が恒常的な摂食調節機構に関与することを報告している。他方、食の嗜好性に対する効果については未検討である。そこで本研究では、SIRT1 による食の嗜好性の制御に着目し、オキシトシン（Oxt）ニューロンにおける SIRT1 によるショ糖嗜好性の制御機構の検討を行った。
【方法】Oxt ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現（OS-OE）およびノックアウト（OS-KO）マウスを作製し、高ショ糖食（HSD）嗜好性試験を行った。さらに、OS-OE マウスへ Oxt 受容体アンタゴニスト（Oxtr-A）を IP 投与し HSD 嗜好性への影響を検討した。加えて、薬物依存的に操作できる Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug（DREADD）テクノロジーを使用し、Oxt ニューロンを人為的に活性抑制することで、OS-OE マウスで上がるショ糖嗜好性をキャンセルできるのか検討した。また、視床下部細胞株で SIRT1 の過剰発現・ノックダウンを行い、遺伝子発現、プロモーター解析を行った。加えて、視床下部細胞株への mouseFGF21（mFGF21）添加実験も行った。
【結果】HSD の嗜好性は、OS-OE マウスで抑制され、OS-KO マウスで増加した。また、OS-OE マウスで減少した HSD 摂食量が、Oxtr-A 投与および Oxt ニューロン活性抑制によりキャンセルされた。細胞株では、SIRT1 過剰発現により *Oxt* と *βKlotho* の遺伝子発現が増加し、ノックダウンでは減少した。さらに、SIRT1 過剰発現により *Oxt* プロモーターの活性が増加した。また、*Oxt* プロモーター上の ARE 配列（NRF2 結合配列）に変異を加えることで、SIRT1 により誘導される *Oxt* プロモーター活性の増加が消失した。加えて、Chromatin immunoprecipitation（ChIP）assay の結果から、SIRT1 は *Oxt* プロモーター上の ARE 配列と NRF2 の結合を促進することが明らかになった。また、細胞株に mFGF21 を添加することで、*Oxt* 発現増加、*Oxt* プロモータ活性増加、*Oxt* プロモータ上 ARE 配列と NRF2 の結合の促進が認められた。
【結論】SIRT1 は FGF21-NRF2-Oxt シグナルを介してショ糖嗜好性を抑制する。

Sirt1, Oxytocin, Fgf21

講演番号：2A23p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A23 会場

アルツハイマー治療薬メマンチンによる社会的敗北ストレス後の PTSD 症状の改善

Improvement of social defeat stress-induced PTSD-like behaviors by NMDA receptor antagonist memantine

○内田 千晶、石川 理絵、喜田 聡（東農大院）
○Chiaki UCHIDA, Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA (Tokyo Univ. of Agriculture)

心的外傷後ストレス障害（Post Traumatic Stress Disorder; PTSD）はトラウマ体験の記憶（トラウマ記憶）を原因とする精神疾患であり、トラウマ記憶のフラッシュバックのみならず、不安障害等の精神症状を示す。現在、PTSD の有効な治療方法は認知行動療法「エクスポージャー療法」であるものの、長期間の面接を要する問題から、治療期間の短縮が望まれている。一方、認知症治療薬である NMDA 受容体非競合的阻害剤メマンチン（MEM）は海馬神経新生を劇的に亢進する作用も示す。現在までに、我々は MEM 投与による成体海馬神経新生亢進が記憶の忘却を促進することを示し、海馬神経新生亢進よるトラウマ記憶の忘却促進によって PTSD 症状が改善される可能性を示してきた（eLife, 2016）。一方、マウスにおける社会的敗北ストレス課題では、攻撃性の高いマウス（攻撃マウス）に繰り返し攻撃を受けることで、攻撃マウスに対する社会回避行動のみならず、慢性的な不安行動の亢進をも引き起こす。そこで、本研究では、新規 PTSD 治療法提案を目的として、社会的敗北ストレス課題を PTSD モデルとして、社会的敗北ストレス誘導性の PTSD 症状に対する MEM 投与の効果を解析した。C57BL/6 雄マウス（2～3 カ月齢）を攻撃性の高い ICR 雄マウスのホームケージに 1 日 10 分間、 10 日間連続して入れ（Social Defeat 処置; SD 処置）、ICR マウスからの攻撃を連日受けさせた（トラウマ体験モデル）。その後、筒に入れた ICR マウスを配置したオープンフィールド内でマウスを探索させて、ICR マウスの近辺（相互作用）領域と遠方（回避）領域における滞在時間を測定した結果、SD 処置群は処置を受けなかった対照群に比較して、近辺領域滞在時間が有意に減少し、一方、遠方領域滞在時間は有意に増加し、攻撃マウスに対する社会回避記憶が観察された。さらに、高架式ゼロ迷路課題により不安行動を評価した結果、SD 群では対照群に比較してオープンセクションにおける滞在時間と侵入回数の有意な低下が観察され、SD 処置が攻撃マウスに対する回避行動のみならず、ストレス誘導性の不安行動、すなわち、PTSD 様症状も誘発することが確認された。その後、MEM（50 mg/kg body weight）を 1 週間毎に計 4 回腹腔内投与し、最終投与 1 週間後に再び行動解析した結果、MEM 投与群では遠方領域滞在時間の有意な減少が観察され、さらに、オープンセクションにおける滞在時間及び侵入回数の有意な増加も観察された。以上の結果から、MEM 投与が、攻撃マウスに対する社会回避記憶の忘却のみならず、ストレス誘導性の不安行動も改善することが示唆された。従って、海馬神経新生亢進による忘却促進により、トラウマ体験を原因とする PTSD の精神症状までもが改善され得る可能性が強く示された。

PTSD, social defeat stress, memantine

講演番号：2A23p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A23 会場

前頭前野を中心とした社会行動と社会的認知記憶を制御する神経ネットワークの同定
Neural circuits in mPFC regulate social behaviors and social recognition memory
○櫻内 華恵、谷水 俊之、石川 理絵、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○Kae SAKURAUCHI, Toshiyuki TANIMIZU, Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA (Dep.of Bioscience, Tokyo Univ.)

社会記憶（他者を覚える記憶）は社会生活を営む上で必要不可欠な記憶であり、社会行動を制御する基盤となる。この社会行動の障害は自閉症を代表とする発達障害や精神疾患における代表的な病態である。マウスの社会記憶を評価する社会的認知記憶課題では、記憶能力を評価する成熟マウスに対して性的に未成熟な幼若マウスを 3 分間提示して、幼若マウスに成熟マウスが接触した時間の長さを測定し、初対面（トレーニング）の時よりも、二度目の対面（テスト）において接触時間が短くなれば幼若マウスを記憶していたと判断する。現在までに、我々はマウス遺伝学的手法を用いて社会的認知記憶形成機構の解明を進めてきた。転写因子 CREB による転写活性化が社会記憶形成に必要であることを明らかにして、さらに、CREB 標的遺伝子である c-fos 発現を指標にして、前頭前野(medial prefrontal cortex；mPFC)、海馬、扁桃体（basolateral amygdala；BLA）と前帯状皮質(anterior cingulate cortex；ACC)が社会記憶形成を制御する脳領域であると同定した。さらに、in silico 解析による神経ネットワークの機能的結合の評価により、ACC と扁桃体は社会行動発現に、一方、海馬と前頭前野は社会的認知記憶固定化により重要であることを示唆してきた。本研究では、マウスの社会行動発現及び社会記憶形成の制御機構の回路レベルでの理解を目的にして、逆行性トレーサーによる神経ネットワーク標識法及び蛍光免疫染色法を用いて、社会行動・記憶形成時に活性化する神経回路の同定とその機能の組織学的解析を試みた。成熟雄マウスの mPFC に逆行性トレーサー retrobeads(RB)を注入後、幼若マウスを 0（0 分群)、1（1 分群）あるいは 3 分間(3 分群)提示し、その 90 分後に蛍光免疫染色に供して ACC、BLA 及び腹側海馬領域におけるトレーサー標識(RB$^+$)ニューロン数と c-fos 陽性(c-fos$^+$)ニューロン数を測定した。社会的認知記憶を形成させる 3 分群の ACC 及び BLA では、過去の結果に一致して、幼若マウスを提示しなかった 0 分群、及び、幼若マウスを提示されたものの社会的認知記憶形成には至らない 1 分群よりも有意に多い c-fos$^+$ニューロンが観察された。重要な点として、3 分群の ACC では 0 及び 1 分群よりも有意に多い c-fos$^+$/RB$^+$二重陽性ニューロンが観察され、一方、1 及び 3 分群の BLA では 0 分群よりも有意に多い c-fos$^+$/RB$^+$二重陽性ニューロンが観察された。以上の結果から、ACC から mPFC への(ACC→mPFC)経路は社会記憶形成時にのみ活性化し、扁桃体 BLA から mPFC への（BLA→mPFC）経路は社会行動発現時に活性化することが示唆された。以上より、これらの神経経路が mPFC を制御することで社会行動並びに社会記憶形成制御に貢献すること、特に、ACC→mPFC 経路が mPFC における社会記憶形成に重要であることが示唆された。

social recognition memory, medial prefrontal cortex, neural circuits

講演番号：2A23p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A23 会場

不快臭に対する嗅覚行動に及ぼすオキシトシン受容体の役割

Oxytocin receptor signaling contributes to the olfactory behavior induced by unpleasant odour.

○長田 和実[1]、宮園 貞治[2]、西森 克彦[3]、柏柳 誠[2]([1]北医療大歯、[2]旭川医大医、[3]東北大農)
○Kazumi Osada[1], Sadaharu Miyazono[2], Katsuhiko Nishimori[3], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sci Univ of Hokkaido., [2]Asahikawa Medcal Univ., [3]Tohoku Univ.)

オキシトシン（OXT）およびオキシトシン受容体（OXTR）は分娩・射乳などの生殖生理学的調節を行うと共に、近年社会的行動の調節、すなわち生殖行動や既知の同種動物の認識などに関連する嗅覚行動も調節することが示唆されている。本研究では不快臭物質（酪酸）を用い、OXTR が基本的な嗅覚行動に及ぼす影響を追求する事を目的として実験を行った。

OXTR-Vinus knock in（$Oxtr^{v/v}$）、ヘテロ（$Oxtr^{v/+}$）、野性型（$Oxtr^{+/+}$） 3 種類のマウスを用意し、長方形のケージを用いて嗅覚に関係しない不安に関連した行動、すなわち行動量測定とオープンフィールド試験を行った。さらに Y-字型迷路を用い、10μL の水と 50%酪酸水溶液をそれぞれ濾紙（2.5cm×2.5cm）に添付し、迷路の両短腕に置き、両短腕へのマウスの滞在時間を 1 日 4 分間 3 日間にわたって連続的に観察し、忌避反応の経時的変化を測定した。

その結果、１）嗅覚とは無関係の行動実験については 3 群間で差は無かった。２）社会的脈絡なしで突きつけた酪酸臭については 1 日目では $Oxtr^{+/+}$ は有意に忌避したが、$Oxtr^{v/+}$ および $Oxtr^{v/v}$ は忌避しなかった。３）2 日目、3 日目では $Oxtr^{v/v}$ は一転して強い忌避反応を連続的に見せたが、他の 2 群のマウスは順応し、忌避反応を示さなくなった。

以上の結果より、OXTR の欠損マウスでは社会的な脈絡がなくても不快臭の忌避に関する嗅覚鈍麻と嗅覚過敏が共存する異常行動が見られ、その一見複雑な行動様式は自閉症スペクトラム患者に見られる感覚障害と共通点が見られた。

oxytocin receptor, olfaction, avoidance behaviour

発表責任者：長田和実（osadak@hoku-iryo-u.ac.jp）

講演番号：2A23p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A23 会場

加齢に伴う味覚感受性の変化
the changes of the taste sensitivity by aging
○藤記 沙耶華[1]、冷水 里穂子[1]、青山 朋樹[2]、林 由佳子[1] ([1]京都大学院農学研究科、[2]京都大学院医学研究科)
○Sayaka FUJIKI[1], Rihoko SHIMIZU[1], Tomoki AOYAMA[2], Yukako HAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景と目的】味覚は温度や湿度といった周りの環境や食文化・食習慣、事前情報やイメージ、栄養状態や生理状態などあらゆるものに影響を受け、また、摂食行動とそれに続く栄養代謝に直接関係し生体にとって健全な生命・生育維持に必要不可欠な決定的役割を果たしている。加齢により味覚機能が低下すると生活の質（QOL）が低下して栄養の偏りや不足が生じ、より味覚機能が低下するという悪循環に陥ってしまうが、いまだ機能低下の原因は明らかとなっていない。本研究では加齢に伴う味覚感受性の変化の解明を目的としヒトに対し官能評価試験を実施した。
【方法】京都府京都市・綾部市に住む認知機能が正常かつ血圧が正常値の範囲内である男女の若齢者、高齢者を対象に認知閾値（味質を識別できる最低濃度）と検知閾値（味溶液を水と区別できる最低濃度）を測定した。被験者に味溶液と水それぞれ 10ml ずつを対で提示し（2 点識別法)、どちらに味がついている（水ではない）と感じるかと具体的にどんな味質を感じたかを答えてもらった。味質を正しく答えられた最低濃度と答えられなかった最高濃度の平均値を認知閾値、水と区別できた最低濃度と区別できなかった最高濃度の平均値を検知閾値とした。検知閾値の場合、きちんと分かっていなくても二分の一の確率で正解を選んでしまうことを考慮し確実性をあげるため不正解の場合一段階濃い濃度に戻り二回連続で区別できた濃度を最低正解濃度とした。味溶液はスクロース（甘味)、クエン酸（酸味)、塩化ナトリウム（塩味)、グルタミン酸ナトリウム（うま味）の味溶液を使用し、苦味は年齢を問わず個人間の感受性差が大きいため評価項目から除外した。
【結果】四味のすべてにおいて若齢者よりも高齢者の方が認知閾値・検知閾値ともに高い値を示し、感受性の低下の傾向が見られた。特に酸味と塩味では約 70%の被験者は若者が確実に何味か判別できた濃度で判別できず、若者と比べ検知閾値で 5 倍以上、認知閾値で 10 倍以上大きな値となったことから、著しく感受性が低下していることが分かった。また甘味・うま味の場合、検知閾値・認知閾値ともに平均付近の濃度に当てはまる被験者が集中したが、酸味と塩味では低濃度から高濃度にもまんべんなく分布しており感受性の低下の程度は被験者によって異なっていた。その低下の程度の差はどこから生じているのかを調べるため、性差、義歯の有無、運動習慣の有無などで比較し検討を行った。なお、この研究は公益財団法人ひと・健康・未来研究財団助成金により行われた。

taste, age, human sensory evaluation test

発表責任者：藤記沙耶華（fujiki.sayaka.36z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A24a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A24 会場

ハイスループット解析に適したヒト嗅覚受容体発現細胞の樹立

Establishment of human olfactory receptor-expressing cell lines for high throughput odorant analysis.

○中村 実世、立松 健司、山﨑 智子、高井 みな実、黒田 俊一 (大阪大　産業科学研究所)
○ Miyo NAKAMURA, Kenji TATEMATU, Tomoko YAMAZAKI, Minami TAKAI, Shun'ichi KURODA (ISIR, Osaka Univ.)

【背景】哺乳動物は数十万種類の匂い分子を嗅ぎ分ける能力を持っているが、嗅覚受容体(OR)はヒトで約 400 種類、マウスで約 1,100 種類と限られている。匂い分子 1 種類が複数種類の OR 群を異なる強度で作動させることが判明しており、中枢神経がその活性化パターン(OR レパートリー)を認識することにより、膨大な数の匂い分子を認識できると考えられている。一方、匂い分子とそれに応答する OR 群の網羅的な関連付けは、マウス嗅神経細胞(OSN)を用いた実験においてある程度の進展が見られるが[1]、ヒト OR についてはヒト OSN の取得が不可能であるため、膨大な匂い分子に比してそれらに応答する OR 群がほとんど特定されていないのが現状である。そこで培養細胞においてヒト OR を発現させる試みが多数なされているが、各 OR 分子のタンパク質翻訳過程が均一でないため、それらの機能を完全に保持して発現させることは困難であった。また、培養細胞における OR の応答測定にはルシフェラーゼがレポーターとして用いられているが、エンドポイント測定でスループット性に欠けており、膨大な匂い分子を用いるアッセイには不適であった。
【目的】我々は、ヒト OR を可能な限り機能を保ったまま発現させ、匂い分子による OR の応答を細胞内カルシウム濃度変化によりリアルタイムかつハイスループットに定量化できる細胞株の樹立を行った。
【結果】哺乳類 OR は G タンパク質共役型受容体ファミリーに属する。匂い分子により作動した OR は OSN 特異的な G タンパク質 $G_{\alpha olf}$ を活性化し、Adenylate Cyclase を作動させて細胞内 cAMP 濃度を高める。次に、3 種類のサブユニット(CNGA2, CNGA4, CNGB1b)からなるサイクリックヌクレオチド感受性チャネルが活性化し、細胞内カルシウム濃度が上昇する。しかしながら、従来のルシフェラーゼを用いた OR 測定系で実績のある 293 細胞は、上記シグナル伝達タンパク質群を発現していない。そこで本研究では、OR の応答を細胞内カルシウム濃度変化により直接かつ連続的に測定できるように、上記シグナル伝達タンパク質群を 293 細胞で安定発現させた。また匂い分子に対する各 OR の応答性を改善するために、OR のシャペロンタンパク質 RTP1, RTP1S, RTP2, REEP1 及び $G_{\alpha olf}$ のシャペロンタンパク質 Ric-8b を組み合わせて共発現させ、各細胞株の匂い分子応答性能についても検討したので報告する。

[1] Suzuki M, Yoshimoto N, Shimono K, and Kuroda S. Deciphering the Receptor Repertoire Encoding Specific Odorants by Time-Lapse Single-Cell Array Cytometry *Sci. Rep.* 6 (2016) 19934.

Olfactory receptors, cyclic nucleotide-gated channel, HEK293 cell

発表責任者：黒田俊一（skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A24a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A24 会場

ブタマクロファージ不死化細胞株の樹立と特性解析

Establishment and chracterization of immortalized porcine macrophage cell lines

○竹之内 敬人[1]、木谷 裕[1]、鈴木 俊一[1]、中井 美智子[1]、淵本 大一郎[1]、月本 光俊[2]、新開 浩樹[1]、佐藤 充[1]、上西 博英[1] ([1]農研機構・動物機能利用、[2]東理大・薬)
○Takato TAKENOUCHI[1], Hiroshi KITANI[1], Shunichi SUZUKI[1], Michiko NAKAI[1], Daiichiro FUCHIMOTO[1], Mitsutoshi TSUKIMOTO[2], Hiroki SHINKAI[1], Mitsuru SATO[1], Hirohide UENISHI[1] ([1]Div. Anim. Sci., NIAS, NARO, [2]Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci)

【目的】養豚業においてブタ感染症の発生は多大な経済的損失を引き起こす。原因となる細菌やウイルスなどのブタ病原体の性状を解析するために、培養細胞を用いた *in vitro* 評価系が利用されている。特に、動物の生体防御において重要な役割を持つマクロファージの細胞株は、宿主と病原体との相互作用を解析するための有効なツールとなる。本研究では、ブタ感染症研究に有用なブタマクロファージの不死化細胞株の作製について検討した。
【方法】ブタ腎臓由来細胞で構成された混合培養系を利用することで、ブタ腎臓あるいは血液からマクロファージを単離・回収した。初代培養したブタマクロファージには、レンチウイルスベクターを用いて不死化遺伝子を導入した。各種細胞マーカーの発現については免疫染色法で検討した。マクロファージの細胞機能としては貪食能とサイトカイン産生能について評価した。
【結果】レンチウイルスベクターを用いて、SV40 Large T（SV40LT）遺伝子とブタテロメラーゼ逆転写酵素（pTERT）遺伝子の２種類を同時に遺伝子導入することで、ブタ腎臓由来マクロファージの不死化細胞株（Immortalized Porcine Kidney-derived Macrophages: IPKM）を樹立した。IPKM 細胞は倍加時間が約 4 日間で、集団倍加数が 40 回以上の増殖能を示した。免疫染色の結果、マクロファージマーカー（CD172a、Iba-1、MSR-A）の発現を確認した。また、蛍光標識したポリスチレンビーズあるいは大腸菌 BioParticles を貪食すること、リポ多糖（LPS）刺激によって炎症性サイトカイン（TNFα、IL-1β）を産生することも観察された。LPS 前処理した IPKM 細胞においては、インフラマソーム活性化に伴い IL-1βの成熟化が促進されることもわかった。これらの結果から、IPKM 細胞は初代培養ブタマクロファージの性質を保持した細胞株であることが示唆された。さらに、IPKM 細胞樹立と同様の手法により、遺伝子改変ブタ（LDL 受容体欠損ブタ）の血液由来マクロファージの不死化にも成功した。
【考察】本研究では、SV40LT と pTERT の２遺伝子の共導入がブタマクロファージの不死化に有効であることを示した。作製されたブタマクロファージ不死化細胞株については、今後、ブタ病原体の性状解析のための *in vitro* 評価系への利用が期待される。

porcine macrophages, immortalization, lentiviral vector

発表責任者：竹之内敬人（ttakenou@affrc.go.jp）

講演番号：2A24a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A24 会場

生体内硫化水素イオンによるメチル化タンパク質は選択的オートファジーを誘発する。
Protein methylation by hydrogen sulfide triggers selective autophagy.
○井上 博文、林 幸奈、大口 真穂、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子（東京農大・応生・健康）
○Hirofumi INOUE, Yukina HAYASHI, Maho OHGUCHI, Rie KATSUMATA-TSUBOI, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. Agri.)

【目的】硫化水素(H_2S)は、生体内の各種臓器で産生されており、一酸化窒素や一酸化炭素に続く第３のガス状分子として、その生理的役割が注目されている。H_2S はメチオニン代謝関連酵素であるシスタチオニンβ合成酵素(CBS)やシスタチノニンγリアーゼ(CSE)により副産物的に産生されており、pH7.4 付近では、約 80%が HS^-として存在することから、生体内で求核反応基として機能することが予想される。先行研究において、求核分子である HS^-は感染や炎症時に過剰に産生される活性酸素種(ROS)に対して、置換反応により細胞内シグナル伝達を制御することが報告されているが、生理的条件下における H_2S が制御するシグナル伝達経路については未だ不透明な点が多い。そこで本研究では、メチオニン代謝の過程で起こるタンパク質翻訳後修飾のメチル化に着目し、H_2S の新規生理作用について検討を行った。
【方法・結果】まず、マウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に硫化水素(HS-)ドナーとして NaHS を各濃度(0～300μM)で 24 時間処理後、WST-8 法による細胞毒性試験を行った。その結果、無処理に対して、NaHS は 100μM までは細胞毒性を示さなかった。続いて、NaHS 処理が CBS のタンパク質発現に影響を及ぼすのか否かについて western blot 法にて解析を行った結果、CBS のタンパク質発現は NaHS 処理濃度依存的に増大した。加えて、CBS がメチオニン代謝に関与することから翻訳後修飾の一つであるタンパク質のメチル化について検討を行った。興味深いことに、CBS 発現と同様に、無処理に対し、NaHS 処理はタンパク質のメチル化レベルを増大させた。そこで、『NaHS 処理によるメチル化タンパク質の増大が細胞内シグナル伝達のトリガー(目印)になり得ないか？』について検討するために、NaHS とプロテアソーム阻害剤である MG132 およびオートファジー阻害剤である 3－メチルアデニン(3-MA)との併用処理を行った。その結果、NaHS 処理より増加したメチル化タンパク質は MG132 との併用処理により減少したが、反対に NaHS と 3-MA 併用処理において、NaHS 単独処理に比し、著しくメチル化タンパク質が増大した。このことから、NaHS 処理はタンパク質分解機構であるオートファジーの活性化を誘導することが示唆されたため、オートファジーマーカー分子 LC3-II およびオートファジー関連分子群 Beclin-1, ATG5, ATG3 のタンパク質発現についての解析を行った。その結果、NaHS 処理により LC3-II の発現および全てのオートファジー関連分子のタンパク質発現が上昇した。
【結論】H_2S(HS^-)の生理的役割を解析した結果、HS^-はタンパク質のメチル化を誘導し、選択的オートファジーを介した分解を行うことで、基底状態での細胞内恒常性維持に関与することが示唆された。

autophagy, protein metylation, hydrogen sulfide

講演番号：2A24a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A24 会場

コレステロール代謝とポリアミン代謝の結節点としての癌細胞の足場非依存的増殖機構

Anchorage independent cancer cell growth as the node between cholesterol and polyamine metabolism

○田中 亜路、柿本 未来、岡本 翔子 (安田女子大薬)
○Arowu TANAKA, Miku KAKIMOTO, Syoko OKAMOTO (Yasuda Women's Univ.)

コレステロールの代謝産物のひとつであり、細胞内コレステロール量に比例して増大する 25-hydroxycolesterol(25-HC)は、大腸癌由来培養細胞(DLD-1,HT-29 など)の足場非依存的増殖能を足場依存的増殖能に対して選択的に阻害することを、発表者は報告している。本学会では、25-HC の作用機序を解明するために化合物ライブラリを使用したセレクションにおいて同定された、ポリアミン合成の律速酵素オルニチンデカルボキシラーゼの阻害剤である Difluoromethylornithine(DFMO)の作用とその機構について発表する。DFMO は 25-HC 同様に足場非依存的増殖能を阻害する一方で、25-HC と同時に処理した場合、25-HC と DFMO の足場非依存的増殖能阻害効果が互いに打ち消される効果を示した。一方で、DFMO の増殖阻害効果は、コレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA レダクターゼの阻害剤である Rosuvastatin によっても部分的に打ち消された。これらのことはコレステロール代謝とポリアミン代謝が、癌細胞の足場非依存的増殖に独立した因子として影響を与えていることを示唆する。

cholesterol, polyamine

発表責任者：田中亜路（tanaka-a@yasuda-u.ac.jp）

講演番号：2A24a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A24 会場

遺伝子導入ニワトリによる TGF-β1 の卵白生産

Production of TGF-β1 in eggwhite using transgenic chicken bioreactor

○上平 正道、大坪 嵩征、小畑 玲奈、河邉 佳典、井藤 彰 (九大工)
○Masamichi KAMIHIRA, Takayuki OTSUBO, Reina OBATA, Yoshinori KAWABE, Akira ITO (Kyushu Univ.)

【目的】TGF-β1 は、初乳にも含まれ免疫調節や細胞の増殖・分化に関わっている重要なサイトカインである。本研究では、我々が開発してきたトランスジェニックニワトリ作製技術[1]を用いて、輸卵管組織での発現システムを用いることで、卵白中に特異的に TGF-β1 を生産するニワトリの作製に成功している。今回の発表では、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎モデルマウスを用いて、TGF-β1 含有卵白の食餌による炎症抑制効果の検証を目的とした。
【方法】オボアルブミン遺伝子の部分プロモーターとトランスアクチベーターシステムを組込んだハイブリッドプロモーターシステム[2]にマウス TGF-β1 遺伝子を組み込んだ発現ユニットを有するレトロウイルスベクターを作製し、ニワトリ胚に微量注入した。胚培養法により人工孵化させた後、体組織での導入遺伝子発現を、PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。また、DSS 誘発大腸炎モデルマウスでの食餌実験により生理効果を評価した。
【結果】胚への遺伝子導入処理によって孵化させたニワトリにおいて、導入遺伝子が各組織で検出されたが、TGF-β1 タンパク質発現としては、輸卵管組織でのみ観察され、卵白中で数μg/ml の濃度で生産されていることがわかった。DSS 誘発大腸炎モデルマウスを用いてトランスジェニックニワトリが生産した TGF-β1 含有卵白の食餌による生理効果を調べたところ、顕著な炎症抑制効果が観察された。

[1] Y. Kawabe et al., *PLOS ONE*, Vol. 7, No. 10, e48512 (2012).
[2] M. Yamaguchi et al., *ACS Synthetic Biology*, Vol. 3, No. 5, pp. 273-279 (2014).

transgenic chicken bioreactor, TGF-beta1, colitis model

発表責任者：上平正道（kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A24a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A24 会場

フタホシコオロギにおける Neuropeptide F による摂食行動の制御機構の解明
Regulation of feeding behavior by Neuropeptide F in *Gryllus bimaculatus*
○清家 瞳、福村 圭介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Hitomi SEIKE, Keisuke FUKUMURA, Shinji NAGATA (Grad, Sch. of Fro, Sci., The Univ. of Tokyo)

背景
生物は生命活動を維持するために、摂食行動により必要な栄養分を摂取しなくてはならない。この摂食行動のモチベーションは、脳神経系から分泌されるペプチド性因子やホルモンなどの生理活性物質により制御されている。例えば、脊椎動物ではペプチド性因子である Neuropeptide Y（NPY）により摂食行動が調節されている。ところが、無脊椎動物においては、NPY のホモログとして Neuropeptide F（NPF）が同定されているが、生体内での機能に関しては不明な点が多い。これまでに、キイロショウジョウバエやトノサマバッタを用いた先行研究では、摂食状態によって NPF の転写量が変動するため、NPF が摂食行動のメカニズムに関わることが示唆されている。しかし、NPF がどのように摂食行動を制御するか、詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、フタホシコオロギを用いて、NPF を中心とした内分泌系による摂食行動の調節メカニズムを明らかにすることを目標とした。
方法・結果
我々が構築したフタホシコオロギの転写物のデータベースから、他の昆虫種の NPF のアミノ酸配列をもとに、演繹アミノ酸配列で相同性を有するコンティグを得た。同様に NPF 受容体（NPFR）のアミノ酸配列と相同性を有するコンティグも得た。これらの塩基配列を用いて、フタホシコオロギの体内での NPF および NPFR の発現を解析した。すなわち、自由摂食をさせたフタホシコオロギ成虫オスの 12 組織由来の cDNA を用いて、定量 PCR および RT-PCR により NPF、NPFR の各組織における発現を解析した。その結果、個体毎で発現組織にばらつきがあったものの、全個体の脳神経系には NPF および NPFR のそれぞれの発現が認められた。次に、24h 絶食させた個体と、その後 9h 再給餌した個体由来の脳における NPF および NPFR の発現量を定量 PCR により分析した。その結果、絶食個体由来の脳での NPF および NPFR の発現量は、再給餌した個体由来の脳での発現量と比較して顕著に増加した。さらに、NPF の dsRNA を調製し、羽化直後のオスのコオロギに注射した。dsRNA の注射 3 日後の脳における NPF の発現量が顕著に減少したため、RNA 干渉法（RNAi）の効果が確認できた。この NPF の RNAi 個体による餌の摂取量を測定したところ、DsRED をコードする dsRNA を投与したコントロール個体と比べて顕著な差は認められなかった。

Neuropeptide F, Feeding behavior, *Gryllus bimaculatus*

講演番号：2A24a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A24 会場

Effects of adipokinetic hormone and its related peptide on maintaining hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA (Univ. of Tokyo)

背景・目的

Homeostatic regulation of nutrient status is vital for maintenance of animal health and survival. Imbalance of lipid or carbohydrate levels *in vivo* or dysfunction of their maintenance mechanisms can easily lead to various disorders. In insects, lipid and carbohydrate mobilization from the fatbody is modulated by adipokinetic hormone (AKH). However, in the cricket, the precursor has not been identified yet. Additionally, AKH/Corazonin-related peptide (ACP) has recently emerged according to characteristic structural and sequence homologies with other insect AKHs from several molecular evolutional standpoints and from genomic and transcriptomic data. Thus, the presence of ACP has been thought as a supportive and complemental hormone of AKH. However, unlike AKH, ACP has not been identified before and its regulatory role of energy homeostasis has yet to be clearly elucidated in the cricket.

方法・結果

In order to assess the effects of AKH and ACP on maintenance of hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. We here identified cDNAs encoding *G. bimaculatus* AKH (*GbAKH*) and *G. bimaculatus* ACP (*GbACP*) from RNA-sequencing data, which are generated by RNA extracted from the corpora cardiaca (CC). In addition, to assess the physiological roles of GbAKH and GbACP *in vivo* in terms of homeostatic regulation, we measured the carbohydrate and lipid levels in the hemolymph and the amount of food intake in response to treatment with these peptides and their knockdown by RNA interference (RNAi). According to the result, *GbAKH* and *GbACP* are predominantly expressed in CC and corpora allata (CA). Also, injection of synthetic GbAKH and GbACP elevated hemolymph carbohydrate and lipid levels and reduced food intake significantly. In contrast, knockdown of *GbAKH* and *GbACP* by RNAi increased the amount of food intake and decrease the hemolymph carbohydrate level. However, the lipid level was not altered by knockdown.

Collectively, this study provides evidence that ACP regulates hemolymph carbohydrate and lipid levels in cricket as well as AKH does, possibly collaborative contribution with AKH to the maintenance of energy homeostasis.

Adipokinetic hormone, AKH/Corazonin-related peptide, Homeostasis

講演番号：2A24a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A24 会場

カイコ *Bombyx mori* における DHCR24 のホモログタンパク質の酵素活性測定

Enzymatic action of DHCR24 homologous protein in the pytophagous silkworm *Bombyx mori*

○藤盛 春奈、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○HARUNA FUJIMORI, SHINJI NAGATA (Grad, Sch. of Fro. Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24)は、コレステロールの *de novo* 生合成経路において、最終中間体であるデスモステロールの 24 位を還元しコレステロールに変換する酵素である。DHCR24 は、哺乳類をはじめとし、植物も含め多くの生物種で認められている。ところが、節足動物はコレステロールを *de novo* で生合成できない。そのため、節足動物では、食餌などからステロール化合物を取り入れ生命を維持していることが知られている。中でも植食性昆虫種は、食餌中の植物ステロールを 4 ステップで酵素的にコレステロールに変換する。この変換の最終段階で DHCR24 が働く。ところが、昆虫における DHCR24 の研究例は、鱗翅目昆虫のタバコスズメガ *Manduca sexta* の腸管で活性が検討されただけに留まっている。そこで本研究では、植食性の鱗翅目昆虫であるカイコ *Bombyx mori* の幼虫の生体組織を用いて DHCR24 の酵素活性を検討した。これまでに、本大会では、カイコから DHCR24 のアミノ酸配列をもとに同定した 2 種の相同タンパク質 BmDHCR24-1 および BmDHCR24-2 の酵素活性についても検討した。

【方法・結果】

先ず、タバコスズメガを用いた先行研究と同様に、カイコ幼虫の中腸から粗抽出液を調製し、ミクロソーム画分を得た。これを粗酵素液とし、基質である重水素標識したデスモステロールを反応させた。反応産物である重水素標識したコレステロールは GC/MS を用いて確認し、酵素活性を検討した。その結果、重水素標識したデスモステロールの大部分がコレステロールに変換されていることが認められた。次に、哺乳類の DHCR24 の酵素活性に必要な FAD と NADPH の二つの補酵素がカイコ DHCR24 でも必要かを検討した。すなわち、上述の粗酵素液による反応において、二つの補酵素を除いて同様に活性を測定した。その結果、反応による産生物の量が減少し、活性が顕著に弱まった。さらに、BmDHCR24-1 および BmDHCR24-2 の哺乳類細胞株での発現用プラスミドを作製し、Hek293 細胞に一過的に発現させ、それら発現産物の酵素活性を測定した。その結果、BmDHCR24-1 には中腸と同様の触媒能が検出されたが、BmDHCR24-2 には検出されなかった。このことからカイコでは、植物ステロールからコレステロールの変換におけるデスモステロールの還元を担うのは、BmDHCR24-1 であることが明らかとなった。

Bombyx mori, cholesterol, DHCR24

講演番号：2A24a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A24 会場

ミズクラゲに対するストロビレーション阻害物質の活性の解析
Phenotypic analysis of strobilation-inhibiting substances for the moon jellyfish, *Aurelia aurita* s.l.
○藤井 夏鈴[1]、黒田 理絵[1]、辻田 菜摘[1]、小山 寛喜[1]、荒川 賢治[2]、国吉 久人[1] ([1]広島大院・生物圏、[2]広島大院・先端研)
○Karin FUJII[1], Rie KURODA[1], Natsumi TSUJITA[1], Hiroki KOYAMA[1], Kenji ARAKAWA[2], Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]1AdSM Hiroshima Univ.)

［背景］刺胞動物ミズクラゲ *Aurelia aurita* s.l.の生活環は、雌雄異体の成体クラゲが有性生殖を行う有性世代と出芽や分裂によって無性的に増殖するポリプの無性世代から成る。ポリプは、冬季に海水温が低下すると、胴体部分に複数の分節ができ（分節形成）、ストロビラへと変態する。分節の形成が終わると触手が退縮し、それぞれの分節は 8 個の弁を持った盤に変化する（形態形成）。その後、各盤は 1 枚ずつ遊離しエフィラとなり、メテフィラ、稚クラゲを経て、成体のクラゲとなる。分節が形成されてから、エフィラが放出されるまでの過程をストロビレーションと呼ぶ。研究室内においては、ポリプの飼育温度を 25℃から 10℃に下げることでストロビレーションを誘導できる。また、通常はストロビレーションが開始しない 25℃でも、indomethacin (IM)や 5-methoxy-2-methylindole (MMI)を投与することでストロビレーションを誘導できることが明らかとなっている[Kuniyoshi *et al.,* 2012, Fuchs *et al.,* 2014]。演者らのグループでは、これまでにストロビレーション阻害物質を複数見出している。本研究では、それらの物質の活性の特徴について詳細に解析した。
［方法］ストロビレーション阻害活性は、以下の生物検定法を用いて評価した。(1) 25℃で飼育したポリプを、試料物質を含む海水 1 mL 中で 10℃で培養した。 (2) 25℃で飼育したポリプを、試料物質と IM または MMI を含む海水 1 mL 中で 25℃で培養した。(3)低温処理によって誘導した分節形成期ストロビラ（分節数 1～3 個）を、試料物質を含む海水 1 mL 中に移し、25℃または 10℃で培養した。(4) IM または MMI で誘導した分節形成期ストロビラ（分節数 1～3 個）を、試料物質を含む海水 1 mL 中に移し、25℃で培養した。(1)(2)では、ストロビレーションの開始が阻害されるかどうか、(3)(4)では、ストロビレーションの進行が阻害されるかどうかを観察した。
［結果］8 種のストロビレーション阻害物質を(1)～(4)の生物検定法に供した結果、次の 2 種類の活性様式に分類された。【ストロビレーション開始阻害活性】(1)(2)ではストロビレーションの開始が阻害されるが、(3)(4)では正常にストロビレーションが進行し、エフィラを放出した(4 化合物)。【分節形成阻害・形態形成阻害活性】(1)(2)ではストロビレーションの開始が阻害され、(3)(4)では分節の形成が停止し、エフィラへの形態変化も阻害され、分節間の各くびれ部分から異所性触手が生じた(4 化合物)。現在、異所性触手の生じた個体について、パラフィン切片による組織学的解析を進めており、その結果についても報告する予定である。

jellyfish, metamorphosis, biological activity

講演番号：2A24a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A24 会場

ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現変動する新規分泌タンパク質遺伝子ファミリーの解析
Molecular analysis of secretory protein genes which are up- or down-regulated during strobilation in the moon jellyfish, *Aurelia aurita* s. l.

○辻田 菜摘[1,4]、辻 敏之[2]、渡部 彰大[1]、小山 寛喜[1]、荒川 賢治[3]、国吉 久人[1] ([1]広島大院・生物圏、[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス、[3]広島大院・先端研、[4]広島大・グローバルキャリアデザインセンター)
○ Natsumi TSUJITA[1,4], Toshiyuki TSUJI[2], Akihiro WATANABE[1], Hiroki KOYAMA[1], Kenji ARAKAWA[3], Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]Dept. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech., [3]AdSM Hiroshima Univ., [4]Global Career Design Center)

【背景】ミズクラゲ(*Aurelia aurita* s.l.)は、無性生殖をおこなう底生性のポリプ世代と、有性生殖をおこなう浮遊性のクラゲ世代とを交互に繰り返す生活環を有する。ポリプ世代からクラゲ世代への転換期においては、海水温の低下を引き金として、ポリプの胴部に数個から十数個のくびれが生じ、分節が形成される（分節形成期ストロビラ）。その後、それぞれの分節はクラゲの形態へと変化し（形態形成期ストロビラ）、稚クラゲであるエフィラとなって海水中に泳ぎ出る。分節の形成からエフィラ放出までの一連の過程はストロビレーションと呼ばれ、一匹のポリプから数倍～十数倍の数のエフィラが放出されるため、成体クラゲの個体数を決定する上で非常に重要なステップとなっている。当グループでは、ストロビレーションの分子機構の解明を目指し、ポリプとストロビラで発現量に差のある遺伝子群(Differentially-expressed Genes; DEG)の同定を進めてきた。また、ストロビレーションは口側から反口側に向けて水平に順序正しく進行することから、非常に高度で複雑な細胞同士の連携によって成立していると考えられる。このような細胞間の情報伝達を担う分子として、分泌タンパク質に着目して解析を進めた。本大会では transcriptome 解析の結果見出された、分泌タンパク質をコードする DEG について報告する。
【方法・結果】ポリプと分節形成期ストロビラからそれぞれ mRNA を調製し、HiSeq™ 2000 (Illumina 社)を用いて RNA sequencing をおこなった。その結果、それぞれのサンプルから約 5G 塩基の配列情報が得られ、assembly によって 48,925 種の遺伝子配列に集約された。これらのうち、ポリプとストロビラで発現量に 2 倍以上差のあった 23,091 種の遺伝子を DEG として同定し、NCBI をはじめとした遺伝子データベース上での annotation の有無によって、既知遺伝子 7,949 種と未知遺伝子 15,142 種に分類した。未知遺伝子すべてについて、SOSUI プログラムによって解析をおこない、アミノ酸配列中にシグナルペプチドを有し、かつ膜貫通ドメインを持たない ORF1,872 種を分泌タンパク質として同定した。その中から、ポリプ特異的遺伝子 *polyp-specific secretory protein* (*psp*)と、*psp* と相同性の高いストロビラ特異的遺伝子 *strobila-specific secretory protein* (*ssp*)を見出した。*psp* および *ssp* の発現パターンは相補的であり、ミズクラゲ体内において全く反対の生理活性を担い合う新規の分泌タンパク遺伝子ファミリーである可能性が示唆された。現在は、*in situ* hybridization によってこれら 2 つの遺伝子を中心に発現解析を進めており、その結果についても報告する予定である。

metamorphosis, moonjelly, secretory protein

講演番号：2A24a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A24 会場

クロマグロ稚魚における飼料入力・糞便出力の代謝反応場追跡手法の開発

Development of monitoring method for metabolic responses from feed input to fecal output in juvenile Bluefin Tuna

○坂田 研二[1]、朝倉 大河[1]、相馬 智史[2]、馬久地 みゆき[2]、伊達 康博[1]、横山 佐一郎[3]、菊地 淳[1,4,5]
([1]理化学研究所、[2]水産研究・教育機構、[3]鹿児島大学・水産、[4]横市院・生命医、[5]名大院・生命農)
○Kenji Sakata[1], Taiga Asakura[1], Satoshi Soma[2], Miyuki Mekuchi[2], Yasuhiro Date[1], Saichiro Yokoyama[3], Jun Kikuchi[1,4,5] ([1]Riken CSRS, [2]FRA, [3]Kagoshima Univ., [4]Yokohama City Univ., [5]Nagoya Univ.)

【背景と目的】
日本は世界第 6 位の排他的経済水域に加え、世界三大漁場の一つを有し様々な海産物によって食文化を支えられている。その中でも世界第 4 位の消費量を誇るマグロ類は我々日本人にとって、大変人気の高い食資源であるが、近年太平洋クロマグロの資源量は顕著な減少を辿り、2014 年には国際自然保護連合 (IUCN)により絶滅危惧種に指定された。そこで我々はこの豊かな生物海洋資源の維持に加え、持続的水産業への貢献を目指し、非侵襲的魚類代謝評価法[1]と組織代謝プロファイリング法[2]の利用、および ^{13}C 安定同位体追跡技術法[3]を援用することにより、完全養殖技術の実用化に向けてボトルネックとなっているクロマグロ稚魚の消化吸収メカニズム解析に焦点を当て、飼料の代謝追跡技術開発を試みた。なお、本研究は水産庁事業「クロマグロ養殖高機能・高効率餌料」により遂行した。
【方法】人工餌にアミノ酸、^{13}C アミノ酸混合物等の栄養素を添加した飼料を作製し、クロマグロ稚魚に給餌した。試験期間中は毎日糞便サンプリングを行い、最終日に稚魚を採集し、個体サンプルは魚体組織毎に解剖を行った。各試料は凍結乾燥し、微粉化処理を行った後、KPi/D_2O により抽出し、NMR 計測した。得られた NMR スペクトルはノンターゲット分析用に数値化し、データ駆動型の多変量解析や機械学習により、クロマグロ稚魚における成長重要因子(栄養素)の探索を行った。
【結果】まず、本研究ではクロマグロとしては世界発となる、糞便試料での代謝解析を可能とした。飼料から糞便への入出力応答を比較すると、消化吸収される成分特徴が NMR スペクトルのノンターゲット解析から情報抽出されることがわかった。また、筋組織中に含まれる水溶性成分の評価では、アミノ酸添加群はコントロール群と比較すると、添加したアミノ酸のシグナル強度が高い傾向があったことから、添加アミノ酸は筋肉中に取り込まれたことが示唆された。更に ^{13}C アミノ酸混合物群では多くのアミノ酸が筋肉中に吸収されたことが明らかとなり、クロマグロ稚魚では世界初のアミノ酸代謝の直接的証拠データの取得に成功した。
Ref. [1] Asakura, T., et al. (2014) *PeerJ*, 2, e550, [2] Yoshida, S., et al. (2014) *Sci. Rep.*, 4, 7005.
[3]Tokuda G., et al. (2014) *Proc. R. Soc. B* 281: 20140990.

NMR, Metabolome, Bluefin Tuna

講演番号：2A24a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A24 会場

ウナギ幼生の飼料候補探索における重要因子選択法の開発
Method of important factor selection for artificial diet of larval Japanese eel
○朝倉 大河[1]、種田 あずさ[1]、稲葉 信晴[2]、長井 敏[2]、黒木 洋明[2]、長谷川 大介[2]、菊地 淳[1,3,4] ([1]理研 CSRS、[2]水産研究・教育機構、[3]横市院 生命医、[4]名大院・生命農)
○Taiga ASAKURA[1], Azusa OITA[1], Nobuharu INABA[2], Satoshi NAGAI[2], Hiroaki KUROKI[2], Daisuke HASEGAWA[2], Jun KIKUCHI[1,3,4] ([1]RIKEN CSRS, [2]FRA, [3]Yokohama City Univ., [4]Nagoya Univ.)

【背景と目的】日本国内でのウナギの消費量は数万トンと言われ、重要な食用魚の一種である。現在国内で消費されているうち 99%以上は養殖場で育った養殖ウナギであるが、その全ては天然のウナギの稚魚に依存した養殖魚である。国立研究開発法人水産研究・教育機構では 2002 年から 2010 年にかけて卵からの人工シラスウナギの生育、人工親魚からの卵を孵化させる「完全養殖」に成功した。しかし量産化のための飼育システムには課題が残り、孵化幼生（レプトセファルス）の適正な環境の構築や餌料のさらなる最適化が必要とされる。本研究は　農水技会の核心的技術開発・緊急展開事業「水産物の国際競争に打ち勝つ横断的育種技術と新発想飼料の開発」によって遂行され、太平洋の北赤道海流を通過するウナギの天然幼生の採集及び周囲の海水の大量ろ過を行い、核磁気共鳴（NMR）による代謝物の一斉観測によって、幼生の筋組織、腸内容物、海水ろ過物の成分の解析をした。さらに養殖幼生及び餌料を加え、天然ウナギ幼生が利用している成分の探索を目的とした。
【方法】天然ウナギ幼生はプランクトンやマイクロネクトン等の採集に用いるネットによって採集し、海水ろ過物は各種材質及び孔径のフィルターとポンプによって得られた。採集した幼生の筋組織と腸内容物、人工餌料は凍結乾燥および粉末化処理を行い、海水ろ過物は超音波処理によって粉末を回収し、KPi/D_2O を加え熱・振とう処理によって抽出後、^{1}H-および ^{13}C-NMR による計測を行った。得られた NMR スペクトルはノンターゲット分析用に数値化し、データ駆動型の多変量解析や機械学習により、天然ウナギ幼生が利用している成分の探索を行った。
【結果】シグナルの強度比較及び主成分分析の結果、ウナギ幼生の種類や天然・人工幼生の特徴を捉えることが可能であった。特に人工幼生には天然幼生と比較して明らかに低い濃度の成分を発見した。また、ウナギ目幼生のサイズに依存する代謝物を、機械学習によって判別し、分岐鎖アミノ酸などが成長に応じて増加することを明らかにした。腸内容物については低分子成分について特徴的なスペクトルを得ることに成功し、天然幼生の摂食物が示唆された。腸内容物の低分子成分は、海水ろ過物とは異なる点が多く、むしろ現在最適化されている餌料に比較的似ていた。天然ウナギ幼生が濾過摂食者でないことが示唆される。また、天然の腸内容物に含まれていて、人工餌料に含まれない成分が、人工幼生筋組織・腸内容物に含まれない成分が一致することを明らかにした。さらに腸内微生物組成についても、同様にサイズに依存した微生物を機械学習により情報抽出した。これらの技術及び結果は人工ウナギ幼生の餌料開発及び量産化技術に貢献するものと考えられる。

NMR, Japanese eel, Marine snow

講演番号：2A24a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A24 会場

魚類多様性の表現型と代謝物・共生微生物データ間のアソシエーション特性解析

Association characteristics of phenotype-metabolites-symbionts in fish biodiversity.

○佐藤 有穂[1,2]、朝倉 大河[1]、坂田 研二[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農）
○ Yuho SATO[1,2], Taiga ASAKURA[1], Kenji SAKATA[1], Yasuhiro DATE[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】水圏環境に生息する魚類は塩濃度や水圧、水流等の多種多様な変化にさらされており、こうした環境変化に対応するため、その進化の過程で代謝応答による環境適応や多様な表現型を獲得するに至った。こうした環境応答は、魚類の体形や運動性、食性にも大きな影響を与え、食性の変化に対応するように代謝能も変化し、宿主とその共生微生物叢による複雑な代謝反応場を形成している。こうした自然環境に生息する魚類の複雑な代謝反応場を解析するためには、環境や食性、共生微生物など多くの因子の関係性を記述することが重要であるが、それらを統合的に評価し可視化する方法は乏しいのが現状である。そこで本研究室ではこれまでに、自然環境中に生息するプローブ生物（魚類）の代謝プロファイルから環境情報を捉える代謝プロファイリング技術の構築[1]や、非侵襲的サンプリングにより魚類の時系列的代謝変化を捉えることが可能な代謝応答評価技術の構築[2]を行ってきた。本研究では、機器分析と情報科学を融合し、細菌叢や有機物組成といった異なる計測データ間から関連性のある項目を浮き彫りにすることが可能なアソシエーション可視化法の構築を試みた。

【実験方法】日本の水圏環境からランダムに多様な魚類（20 目 65 科 117 属 157 種 339 個体）をサンプリングし、腸内容物の細菌叢と有機物組成を調べた。細菌叢解析では DNA を抽出した後、次世代シーケンサーMiSeq を用いて配列を決定して RDP classifier によって分類データを得た。有機物組成は、核磁気共鳴法（NMR）による計測（HSQC、2D-*J*res NMR）によってデータを取得した。細菌叢・有機物組成を決定付ける要因について調べるべく、PCA やマーケット・バスケット分析（MBA）[3]といった各種解析を行った。

【結果】ヒトやマウス等の哺乳類の腸内環境と比較して、腸内細菌叢はほとんどの魚種で Proteobacteria が最も多く、また嫌気発酵産物の有機酸は少ない傾向にあった。細菌叢と有機物組成については PCA などの各種多変量解析を行うとともに、さらに表現型や食性などの定性情報を加えて統合的な解析を MBA ネットワークで可視化することを試みた。年会では教師付き学習や多段階アルゴリズム等を駆使した分類特性や、ネットワーク解析における中心性や重要因子抽出の戦略について議論する。

【参考文献】[1] Yoshida, S.; Date, Y.; Akama, M.; Kikuchi, J. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 7005. [2] Asakura, T.; Sakata, K.; Yoshida, S.; Date, Y.; Kikuchi, J. *PeerJ* **2014**, 2, e550. [3] Shiokawa, Y.; Misawa, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 2714-2719.

fish phenotype, microbiome, network analysis

講演番号：2A24p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A24 会場

哺乳類の染色体構造変化を単一細胞で網羅的に解析する
Mapping chromosomal organization genome-wide in single mammalian cells

○竹林 慎一郎（三重大医）
○Shin-ichiro TAKEBAYASHI (Mie Univ.)

DNA 複製は、ゲノム DNA を倍加するという細胞増殖にとって根元的なプロセスである。この時、同時にクロマチン成分の倍加も行われるため、エピジェネティックな修飾の変化や維持にとっても重要なプロセスである。哺乳類の DNA 複製は、複製ドメインと呼ばれる複製開始やフォークの進行が協調して制御される染色体機能ユニットで行われており、これにより巨大なゲノムを効率的に倍加している。複製ドメイン構造は、発生段階でダイナミックに変化し、染色体高次折り畳みパターンとも高い相関があることが分かっている。

今回我々は、次世代シーケンサーを用い、哺乳類染色体複製ドメイン構造を単一細胞レベルで、かつゲノムワイドに調べることができる新しい技術を確立したので報告する。またこの手法を用いることで、これまでアプローチが困難であったエピゲノム制御の特性にも迫ることができたので、あわせて報告する。

mammalian chromosome, chromosomal organization, single cell

発表責任者：竹林慎一郎（stake@doc.medic.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A24p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A24 会場

DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷機構：DNA メチル化酵素 KO 細胞へのヘミメチル化 DNA の導入
The mechanism of DNA damage induced by hemimethylated DNA
○奥村 克純[1]、服部 楓[1]、柴田 隆豊[1]、緒方 進[1]、緒方 正人[2]、竹林 慎一郎[2]([1]三重大院生資、[2]三重大院医)
○Katsuzumi Okumura[1], Kaede Hattori[1], Takahiro Shibata[1], Shin Ogata[1], Masato Ogata[2], Shin-ichiro Takebayashi[2] ([1]Biores., Mie Univ., [2]Med., Mie Univ.)

【目的】
栄養成分の欠乏等によるエピジェネティクス異常と生活習慣病などの疾患との関連性が近年注目されている。我々はエピジェネティック修飾の一つであるゲノム DNA のメチル化が阻害されると DNA 二本鎖切断が起こることを見出し，その分子機構モデルを提案している。ゲノム上の DNA のメチル化は DNA２本鎖の配列の 5’-CG-3’/3’-GC-5’の C の両方の鎖に起こるが，ゲノム上のメチル化部位のパターンは維持メチル化反応により，細胞分裂を経ても安定に継承される。すなわち，DNA 複製直後，２本鎖 DNA の鋳型鎖のみがメチル化されたヘミメチル化 DNA が生じたことを UHRF1 が認識し，維持メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1)がリクルートされ，新生鎖にメチル基が付加される。我々のモデルは，栄養成分の欠乏による細胞内のメチル化基質の供給不足や DNMT1 の発現低下により，メチル基が付加されないと，ヘミメチル化 DNA に UHRF1 が結合したままとなり，次の細胞周期で DNA 複製期を迎えるとこれが障害となって DNA 損傷が起こるというものである。本研究では，三種の DNA メチル化酵素が欠損し，ゲノム DNA に全くメチル化がない ES 細胞(TKO)や UHRF1 を欠損させた TKO を作製し， これらを用いて DNA 損傷誘導モデルを検証することを目的とした。
【方法・結果】
まず，TKO の複製中の DNA 鎖にメチル化 dCTP を取り込ませ，ゲノム DNA 上にヘミメチル化部位を生じさせた。免疫蛍光染色法により細胞核内に形成される γ-H2AX (DNA 二本鎖切断マーカータンパク質)の局在数をカウントし，DNA 損傷レベルを解析した。その結果，局在数は次の DNA 複製期以降に有意に増加していた。すなわち，ヘミメチル化部位に UHRF1 が結合したまま次の DNA 複製期を迎えると複製装置が衝突し，DNA２本鎖切断が引き起こされるモデルの妥当性を示せた。次に，UHRF1 と複製装置の衝突が DNA 損傷の原因であることをより明確にするために，ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを利用して *Uhrf1* を欠損させた TKO を作製した。遺伝子およびタンパクレベルで欠損させたことを確認し，さらに解析を進めている。

epigenetics, DNA damage, DNA replication

発表責任者：奥村克純（katsu@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A24p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A24 会場

細胞核構造維持と遺伝子発現制御における核内 F-アクチンの機能解析
Functional analysis of F-actin in the cells nucleus: its possible involvement in nuclear structure and gene regulation

○高橋 祐人[1]、山本 浩志[2]、山崎 祥他[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]理化学研究所)
○Yuto TAKAHASHI[1], Koji YAMAMOTO[2], Shota YAMAZAKI[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ Graduate School., [3]RIKEN Center.)

アクチンは全ての真核生物の細胞内に豊富に存在するタンパクで、単量体 G-アクチンと、重合体 F-アクチンの二つの形態で存在する。大部分のアクチンは細胞質に存在し、細胞の運動、分裂、形態変化、骨格形成など様々な機能に関与する。一方で、アクチンの一部は細胞核内に存在する。近年、核内でもアクチンが重合して F-アクチンを形成し、この核内 F-アクチンが細胞機能やエピジェネティクスの制御において重要な機能・役割を持つことが示されている。例えば、体細胞クローンの作成過程における遺伝子発現の初期化(リプログラミング)の際に核内 F-アクチンが観察され、この核内 F-アクチンは初期化因子 *OCT4* 遺伝子の転写活性化に必要である(1)。本研究室では、人為的に核内 F-アクチンを形成させた培養細胞を用いることで、核内 F-アクチンの細胞機能やエピジェネティック制御への影響を解析している。

アクチンに、蛍光タンパク EYFP と核移行シグナル（NLS）を付与した融合タンパク質 EYFP-NLS-actin をコードするプラスミドを HeLa 細胞に導入し、核内 F-アクチン形成を誘導した。核内 F-アクチンは Wnt/β-catenin シグナルの転写共役因子であるβ-catenin と共局在し、それに伴い核内のβ-catenin 量が増加することを発見した(2)。さらに、EYFP-NLS-actin の導入により、Wnt/β-catenin シグナルが活性化し、ターゲット遺伝子の転写を促進することを明らかにした。これらの結果から、核内 F-アクチンの形成が、発生や分化に重要な Wnt/β-catenin シグナルの制御に関与する可能性が示された。しかし、HeLa 細胞では EYFP-NLS-actin による核内アクチン形成効率が低かったため、NIH3T3 細胞に EYFP-NLS-actin プラスミドをエレクトロポレーション法で導入することで、高効率で核内 F-アクチンを形成させる実験系を確立した。

この実験系を用いて、現在、核内 F-アクチンが核の構造維持や機能発現に果たす役割の解析を行っている。核内アクチンは核膜の構成因子の一つとして重要なラミンと相互作用することが知られていることから、核内アクチンとラミンとの機能的関連性についても解析を進めている。

(1) Yamazaki, S. et al., Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 79: 242-246, 2015.
(2)Yamazaki, S. et al., Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β-catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. Histochem Cell Biol. 145: 389-399, 2016.

actin, cell nucleus, gene expression

発表責任者：高橋　祐人（tear403forbidden@gmail.com）

講演番号：2A24p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A24 会場

G-アクチン結合性二重環状ペプチドを用いた細胞核内アクチンの機能解析
Bicyclic peptide binding to G-actin: as an artificial antibody for analyzing nuclear actin
○平塚 晶吾[1]、町田 奈々子[2]、秋山 祐亮[2]、Christian Heinis[3]、Bertoldo Davide[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大・農、[2]東北大学院・農、[3]EPFL・LPPT)
○Shogo HIRATSUKA[1], Nanako MACHIDA[2], Yusuke AKIYAMA[2], Christian Heinis[3], Bertoldo Davide[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku University Graduate School, [3]EPFL・LPPT)

発生分化の過程や環境に応答した遺伝子発現制御はエピジェネティクスとよばれ、DNA とヒストンによって形成されるクロマチンと細胞核の構造変化がその基本メカニズムとなっている。近年の研究から、細胞核に存在するアクチンが、クロマチンと細胞核の構造と機能に関与することが示されている。アクチンは酵母からヒトまで進化的に高度に保存されており、細胞内で単量体の G-アクチン(globular-actin)と重合体の F-アクチン(filament-actin)の２つの形態で存在する。細胞核内では、G-アクチンがクロマチンリモデリング複合体の構成因子として機能すると共に、細胞内シグナル因子である SRF や Wnt/β-catenin の制御にも関与していることが報告されている。しかし、G-アクチン特異的に結合するプローブや抗体についての報告は未だ少なく、細胞核内の G-アクチンの機能解析は進んでいない。そこで我々は、約 20 アミノ酸からなる二重環状ペプチド(Bicyclic Peptide; BP)[1)]を細胞核内 G-アクチンの機能解析ツールとして用いることを試みた。BP は化学合成が可能であり、標的に対し非常に高い親和性と特異性を有しているため、人工抗体や新規分子プローブとして応用が期待されている。我々は、G-アクチンには強く結合するが F-アクチンにはほとんど結合しない BP (G-Actin Bicyclic Peptide; GA-BP)をスクリーニング・化学合成し、その評価を行った。培養細胞への GA-BP の導入に成功したことから、生細胞内での GA-BP と G-アクチンとの結合性を解析した。共免疫沈降により、G-アクチンと GA-BP の結合が確認された。さらに、F-アクチンへの重合能が失われたアクチン変異体を発現させた NIH3T3 細胞に対して GA-BP を導入し、GA-BP と G-アクチンとの共局在を顕微鏡下で確認した。一方で、F-アクチンと GA-BP の共局在は確認されなかった。

つぎに、GA-BP がアクチン重合に与える影響の検証を、細胞分裂期の収縮環の機能を指標として行った。細胞周期を分裂期に同調した HeLa 細胞へ GA-BP を導入したところ、収縮管機能の阻害が確認された。また、細胞核内の G-アクチン機能解析を目的として、核移行シグナル (NLS) を付加した GA-BP (NLS-GA-BP)を合成して生細胞に導入したところ、NLS-GA-BP の細胞核への移行・集積が観察された。これらの結果は、細胞核内の G-アクチンプローブや、細胞核内での新規 F-アクチン形成抑制するツールとして、NLS-GA-BP が利用可能であることを示している。そこで、NLS-GA-BP を導入した培養細胞を用いて、遺伝子発現のエピジェネティック制御やクロマチン・細胞核の機能についての解析を進めている。

１)Heinis、C. et al., Nat Chem Biol., 5(7):502-7 (2009)

Actin, Artificial antibody, Bicyclic peptide

発表責任者：平塚　晶吾（hirasho56721@gmail.com）

講演番号：2A24p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A24 会場

リジン長鎖アシル化修飾による転写因子 TEAD の活性制御機構の解析

The study on the regulatory mechanism of the transcription factor TEAD by lysine long-chain fatty acylation

○則次 恒太[1,2]、伊藤 昭博[2,3]、小川 健司[4,5]、鈴木 健裕[6]、堂前 直[6]、吉田 稔[1,3,4,5]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東薬大・生命科学、[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス、[4]理研・化学遺伝、[5]理研・環境資源・創薬シード、[6]理研・環境資源・生命分子解析）

○ Kota NORITSUGU[1,2], Akihiro ITO[2,3], Kenji OGAWA[4,5], Suzuki TAKEHIRO[6], Naoshi DOHMAE[6], Minoru YOSHIDA[1,3,4,5] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [3]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [4]Chem. Genet. Lab., RIKEN, [5]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS, [6]Biomolec. Character. Unit, RIKEN CSRS)

近年、既存のリジン脱アセチル化酵素のうち、いくつかがリジン脱長鎖アシル化活性を有していることが報告され、リジン長鎖アシル化が新たな翻訳後修飾として注目されている。われわれは独自に行ったランダム修飾プロテオームにより、がん抑制経路である Hippo シグナルの制御下にある転写因子 TEAD のファミリー間、および種を超えて保存されているリジン残基がミリストイル化およびパルミトイル化されていることを見いだした。

TEAD は転写共役因子の YAP/TAZ と結合することで標的遺伝子の発現を制御しており、発生やがん化に寄与している。この結合は Hippo 経路による YAP/TAZ のリン酸化を介して制御されていることが知られており、また最近になって TEAD のシステイン残基における自己パルミトイル化が YAP/TAZ との結合および TEAD の安定化に寄与していることが報告された。しかしながら TEAD のリジン残基における長鎖アシル化修飾の制御機構と生理的な意義については全く知られていない。

我々はこれまでに、TEAD のリジン長鎖アシル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、TEAD のシステイン残基だけでなくリジン残基においても自己アシル化が起こること、またこのリジンアシル化には、報告されている自己パルミトイル化部位であるシステイン残基が必須であることを報告した。本発表では、TEAD のリジン脱長鎖アシル化を担う酵素について報告する。細胞に TEAD2 と共に各種サーチュインファミリータンパクをそれぞれ発現させたところ、SIRT1 との共発現において TEAD2 のリジン長鎖アシル化レベルが顕著に減少することを見いだし、SIRT1 が TEAD の脱アシル化酵素である可能性を示唆する結果を得た。現在 SIRT1 が直接 TEAD の脱アシル化を行っているかについて詳細に検討を行っている。また、TEAD の転写活性におけるリジン長鎖アシル化修飾の意義を明らかにするために、GAL4 融合 TEAD を用いたレポーターアッセイを構築した。本発表において TEAD のリジンアシル化が転写活性に与える影響についても議論したい。

Lysine long-chain fatty acylation, Post-translational modifications, TEAD

発表責任者：則次　恒太（kota.noritsugu.4312@gmail.com）

講演番号：2A24p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A24 会場

マウス胚性腫瘍細胞の神経分化過程における Prdm 遺伝子の機能解析

Function of Prdm genes for neural differentiation of mouse embryonic carcinoma cells

○馬場 映[1]、土井 信太郎[1]、須和田 拓耶[2]、久原 哲[1]、田代 康介[1] ([1]九州大 院生資環　遺伝子制御、[2]九州大 農　応生　遺伝子制御)
○ Akira BABA[1], Shintaro DOI[1], Takuya SUWADA[2], Satoru KUHARA[1], Kosuke TASHIRO[1] ([1]Kyushu Univ., Fac., Agri., Mol.Gene Tech., [2]Kyushu Univ., Agri., Mol.Gene Tech.)

多細胞生物は受精卵という 1 つの細胞が様々な機能や形態を有する細胞に分化、増殖することで個体を形成している。このような多様性は細胞内で転写制御システムが機能することに起因している。この発生過程において細胞運命決定において重要な転写制御システムとしてはヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティック制御系が機能していると考えられている。Prdm 遺伝子は PR ドメインと zinc finger ドメインを有しており、特異的な DNA の周辺クロマチン構造をヒストンメチル化によって変化させ、遺伝子の発現を制御しているとされ、細胞分化過程で機能していると推定されている。我々は、マウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞の神経分化過程において、Prdm 遺伝子のうち Prdm8 と Prdm12、Prdm13 の発現が一過的に上昇することが明らかとしているが、それらの分化過程における具体的な機能は解明されていない。本研究では、P19 細胞における Prdm8、Prdm12、Prdm13 の神経分化過程での機能解明を目的とした。

P19 細胞はレチノイン酸を添加することで神経細胞へと分化するという特徴を有しており、神経分化モデル細胞として利用されている。この細胞を材料として CRISPR/Cas9 による Prdm8、Prdm12、Prdm13 遺伝子のノックアウト(KO)細胞を作製し、レチノイン酸による神経分化誘導を行った。分化過程における野生型(WT)細胞及び KO 細胞の形態的変化や遺伝子発現を、ニューロン分化マーカーである β-tubulin3 やアストロサイト分化マーカーである Glial fibrillary acidic protein (Gfap)などを用いた定量 PCR や免疫抗体染色によって解析した。

その結果、神経分化誘導後、KO 細胞では、WT 細胞と比べ β-tubulin3 や Gfap などの神経関連遺伝子の発現に変化がみられ、Prdm 遺伝子ノックアウトによって神経関連細胞の分化が影響を受けることが判明した。この結果は Prdm8、Prdm12 及び Prdm13 遺伝子が神経分化過程に機能を有していることを示唆しており、今後、これらの遺伝子の機能の解明が、細胞の神経分化メカニズムの解明につながることが期待される。

neural differentiation, Prdm, gene regulation

発表責任者：馬場　映（a.baba@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A24p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A24 会場

脳卒中発症ラット SHRSP において発育低下がみられる骨格筋の遺伝子発現解析
Gene expression analysis of skeletal muscle in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

○井上 敬夫[1]、萩山 満[1]、水口 信行[2]、木村 竜一朗[1]、前西 修[1]、筑後 孝章[1]、木村 雅友[1]、伊藤 龍生[3]、佐藤 隆夫[4]、伊藤 彰彦[1]([1]近大・医・病理、[2]近大・ライフサイエンス研、[3]近大・農・食品栄養、[4]近大附属病院・病理診断科)
○Takao INOUE[1], Mitsuru HAGIYAMA[1], Nobuyuki MIZUGUCHI[2], Ryuichiro KIMURA[1], Osamu MAENISHI[1], Takaaki CHIKUGO[1], Masatomo KIMURA[1], Tatsuki ITOH[3], Takao SATOU[4], Akihiko ITO[1] ([1]Kindai Univ. Fac. Med. Dep. Pathol., [2]Kindai Univ. Inst. Life Sci., [3]Kindai Univ. Fac. Agric. Dep. Food Sci. & Nutr., [4]Kindai Univ. Hosp. Dep. Hosp. Pathol.)

【目的】高血圧により脳卒中を発症するラット SHRSP は正常血圧ラットである WKY と比較して骨格筋の発育が病態依存的に低下している。近年、骨格筋から分泌されるマイオカインが身体恒常性の維持と密接な関係があることが示されていることから、SHRSP の骨格筋の発育低下と病態増悪との間に関連性があると考えた。本研究では、この仮説を検証するために、WKY 及び SHRSP における骨格筋の発現遺伝子について解析を行った。

【方法】12 週齢の雄性 WKY 及び SHRSP よりヒラメ筋を採取し、RNA を調製した。Microarray に供し、発現差のみられる遺伝子(fold change：≧2.0、≦－2.0、p<0.05)を選び出した。更に、これらの遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にて解析を行うことにより、SHRSP における骨格筋の発育低下や病態との関連性について調べた。

【結果】Microarray 解析より、SHRSP では WKY に対して 259 個と 143 個の遺伝子の発現がそれぞれ増加、減少していた。これらの遺伝子を IPA にて解析を行ったところ、SHRSP では骨格筋量を増加させる方向に遺伝子が発現していることが明らかとなった。また、遺伝子発現解析から関連が示唆される病態として、腎不全、肝細胞壊死、心肥大などが挙げられた。

【考察】SHRSP において骨格筋量を増加させる方向に遺伝子が発現していたが、実際の表現型として、SHRSP では骨格筋の発育低下がみられる。従って、本研究において発現差のみられた遺伝子の中に、骨格筋の発育を妨げる、あるいは発育に必要とされる新規の遺伝子が存在することが示唆された。

SHRSP, hypertension-related diseases, skeletal muscle disorders

発表責任者：井上敬夫（takao@med.kindai.ac.jp）

講演番号：2A24p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A24 会場

グルココルチコイドによる筋萎縮関連遺伝子の発現誘導をビタミン D が抑制する

Vitamin D suppresses the induction of muscle atrophy related gene by glucocorticoid

○広瀬 優真、大西 拓己、畑澤 幸乃、亀井 康富（京府大生命環境科学）
○Yuma HIROSE, Takumi ONISHI, Yukino HATAZAWA, Yasutomi KAMEI (Kyoto Prefectural Univ.)

【背景・目的】
骨格筋はエネルギー代謝や運動などにおいて重要な役割を果たす。骨格筋の萎縮は寝たきりや加齢などにより生じ、生活の質(QOL)を低下させる。そのため、骨格筋の維持は健康増進の観点から重要である。今後、日本を含む先進国では超高齢化が進み、介護や社会保障費の観点から加齢性筋萎縮（サルコペニア）を防ぐことが求められる。高齢者はビタミン D 欠乏に陥りやすく、血中ビタミン D が低値であるとサルコペニアのリスクが増加するという報告がある。しかし、筋萎縮に対するビタミン D の作用機序等の詳細はよく分かっていない。そこで我々は培養細胞を用いて、ビタミン D による筋萎縮抑制作用を調べた。
【方法】
C2C12 筋細胞に合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン（DEX）などの筋萎縮誘導剤を添加した。そこにビタミン D を添加し、筋萎縮に重要な転写調節因子である FOXO1 及びその標的遺伝子であるカテプシン L（リソソームタンパク質分解酵素）や Atrogin-1（ユビキチンリガーゼ）などの筋萎縮時に増加する遺伝子の発現変化を調べた。またレポーター（ルシフェラーゼ）アッセイにより転写活性を測定する評価系を用いて、ビタミン D 添加時の FOXO1 の転写活性を測定した。
【結果・考察】
DEX を添加した C2C12 筋細胞において、筋萎縮関連遺伝子であるカテプシン L、Atrogin-1 の遺伝子の発現増加が観察された。また FOXO1 の遺伝子発現は DEX 処理により、増加傾向が観察された。興味深いことに、ビタミン D の添加により、DEX 誘導性のカテプシン L、Atrogin-1 の発現増加が抑制された。しかし一方で FOXO1 の遺伝子発現増加抑制は観察されなかった。ルシフェラーゼアッセイ系を用いて FOXO1 の転写活性を測定したところ、ビタミン D の添加により FOXO1 の転写活性が抑制することが観察された。これらの結果より、ビタミン D は FOXO1 の転写活性を抑制し、その標的遺伝子である筋萎縮関連遺伝子の発現抑制を介して、筋萎縮を抑制する可能性が示唆された。

muscle atrophy, vitamin D, glucocorticoid

講演番号：2A24p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A24 会場

nxt2 は外部環境の違いによりその転写様式を調節する

nxt2 expression is regulated by the transcriptional level in response to the external environment

○北谷 優弥[1]、猪瀬 春子[1,2]、西野 勝俊[1]、神戸 大朋[1]、永尾 雅哉[1]、増田 誠司[1]([1]京都大学生命科学研究科、[2]京都大学農学研究科)
○Yuya Kitadani[1], Haruko Inose[1,2], Katsutoshi Nishino[1], Taiho Kambe[1], Masaya Nagao[1], Seiji Masuda[1] ([1]Kyoto Univ. Biostudy, [2]Kyoto Univ. Agriculture)

真核生物において、ｍＲＮＡは核内で合成された後、核外輸送受容体に認識されて、核膜孔を通って細胞質に輸送される。ＮＸＴは核外輸送受容体の１つであり、ＴＡＰとヘテロダイマーを形成してｍＲＮＡ核外輸送を促進する。*ｎｘｔ*はハエからヒトまで進化的に広く保存されており、多くの真核生物では１種類の*ｎｘｔ*遺伝子（*ｎｘｔ１*）を持つ。一方、哺乳類では互いに高い相同性を持つ*ｎｘｔ*遺伝子（*ｎｘｔ１，ｎｘｔ２*）が存在する。特に、ヒト*ｎｘｔ２*には転写開始点の違いによって３種類のアイソフォーム（以下*ｎｘｔ２Ａ，ｎｘｔ２Ｂ，ｎｘｔ２Ｃ*）が存在する。当研究室の研究より、ＮＸＴ１とＮＸＴ２ＢはＴＡＰを介したｐｏｌｙ（Ａ）ＲＮＡ核外輸送を促進するのに対して、ＮＸＴ２Ｃは抑制することが示唆されている。このことから、哺乳類はＮＸＴ２の転写バリアントの発現量を調節してｐｏｌｙ（Ａ）ＲＮＡ核外輸送を調節していると考察されているが、具体的な調節メカニズムは明らかにされていない。また、先行研究より、*ｎｘｔ２*転写開始点上流はメチル化されているが、メチル化が外れた際には*ｎｘｔ２*の転写レベルが上昇することが報告されている。しかし、どのアイソフォームの発現量が増加しているかは不明である。

本研究は、*ｎｘｔ２*の転写メカニズムを明らかにするために*ｎｘｔ２*各アイソフォームのプロモーターを同定した。また、ＮＸＴ２の機能が細胞増殖に関与しているかを明らかにするために、様々な条件下で培養した細胞の*ｎｘｔ２*遺伝子の各アイソフォームのｍＲＮＡ量をリアルタイムＰＣＲによって定量した。

ルシフェラーゼによるレポーターアッセイを行い、*ｎｘｔ２Ｂ，ｎｘｔ２Ｃ*のプロモーター領域を同定した結果、共に転写開始地点から上流３００ｂｐで活性が見られた。データベースによると*ｎｘｔ２Ｃ*の上流約３００ｂｐ付近にＣｐＧアイランドが存在することから、エピジェネティックな制御を受けているかについて検討している。一方、*ｎｘｔ２Ｂ*の転写制御についてもどのような可能性が示唆されるか本発表の場で議論したい。細胞密度によって*ｎｘｔ２*のｍＲＮＡレベルが変化するかリアルタイムＰＣＲで定量した結果、*ｎｘｔ２Ｃ*のｍＲＮＡレベルは変わらなかったが、細胞密度が増加するほど*ｎｘｔ１，ｎｘｔ２Ｂ*のｍＲＮＡレベルが減少する傾向が見られた。また、培地に含まれる血清濃度を変えて培養し、定量を行ったところ、*ｎｘｔ２Ｃ*のｍＲＮＡレベルは変わらなかったが、血清濃度が低くなるほど*ｎｘｔ１，ｎｘｔ２Ｂ*のｍＲＮＡレベルが増加する傾向が見られた。このことから、細胞は生育状態に応じて*ｎｘｔ１，ｎｘｔ２Ｂ*の発現量を制御していることが示唆された。

NXT2, NXT1, mRNA export

講演番号：2A24p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A24 会場

RNA ヘリカーゼ URH49 の新規相互作用因子の同定および機能解析

The identification of proteins interacting with RNA helicase URH49

○原田 光太郎、藤田 賢一、西野 勝俊、神戸 大朋、永尾 雅哉、増田 誠司（京大院　生命）
○Koutarou HARADA, Kenichi FUJITA, Katutoshi NISHINO, Taihou KANBE, Masaya NAGAO, Seiji MASUDA (Kyoto Univ.)

真核生物の遺伝子発現において、遺伝子は pre-mRNA として転写され、キャッピング、スプライシング、ポリアデニル化の各プロセシングを受け、成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は mRNA 核外輸送体を含む一連の因子によって細胞質へと輸送され、翻訳の鋳型となる。mRNA の核外輸送を担う因子は酵母からヒトまで高度に保存されている。ヒトでは、その因子として UAP56 が TREX 複合体を形成することで mRNA の核外輸送を行う。加えて、UAP56 のパラログとして高い相同性を示す URH49 が存在しており、興味深いことに UAP56 と URH49 では形成する複合体および輸送する mRNA が異なることが当研究室の先行研究により明らかになった。すなわち UAP56 は TREX 複合体を形成し恒常的に働く一方で、URH49 は AREX 複合体を形成し細胞増殖時に働く。しかし互いに高い相同性を持つ UAP56 と URH49 が異なる複合体を形成して異なる mRNA を輸送するメカニズムは分かっていない。その分子メカニズムの解明は高等真核生物における多様化した mRNA の核外輸送経路の理解につながると期待される。

UAP56 を含む TREX 複合体においては約 10 種類の因子が同定されているのに対して、URH49 を含む AREX 複合体では CIP29 のみしか分かっていない。つまり、未知の AREX 複合体構成因子が存在する可能性が高いと考えられた。そこで本研究では AREX 複合体を構成する新規因子の同定と機能解析を目指して、URH49 と相互作用する因子の網羅的な同定から開始した。

URH49 を用いた共免疫沈降から得られた因子を LC/MS により解析することで、多くの新規 URH49 相互作用因子を同定した。次いで、これらの因子が mRNA 核外輸送に関わるかについて siRNA を用いたノックダウンもしくは因子を過剰発現させた細胞では poly(A)+RNA の核内蓄積が増加した。このことから同定した因子が mRNA 核外輸送に関わることが分かった。現在 AREX 複合体の構成因子として機能しているかを含めた作用機序についての解析を進めており、本学会ではこれらを含めて議論したい。

selective mRNA exporter, interactome analysis, RNA processing

発表責任者：原田　光太郎（harada.koutarou.84x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A24p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A24 会場

ドーパミン D1/D5 受容体と cAMP 情報伝達経路による海馬依存性記憶想起のサーカディアン制御
Circadian regulation of hippocampus-dependent memory retrieval by dopamine D1/D5 receptors and cAMP signaling pathway
○六川 智博、長谷川 俊介、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○Tomohiro ROKUKAWA, Shunsuke HASEGAWA, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ of Agriculture)

サーカディアンリズム産生を司る生物時計は学習・記憶能力を中心とする認知機能を制御すると考えられているものの、認知機能との関連性の実態は未だ不明である。我々は前脳時計機能と学習・記憶能力との関係を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1(dnBMAL1)を発現する遺伝子改変マウス(dnBMAL1 マウス)を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めてきた。現在までに dnBMAL1 マウスは前脳領域の時計機能に障害を示すこと、最も重要な点として、時間帯依存的（明期開始後 10 時間付近; ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示すことが明らかとなった。さらに、野生型マウスにも時間帯依存的な想起効率の変化が認められることから、前脳時計機能が記憶想起を制御すると結論した。本発表では、次世代シークエンサーを用いた海馬領域の RNA-Seq 解析と行動薬理学的解析を行い、前脳時計機能による想起制御の分子機構の解析を進めた結果を報告する。RNA-Seq 解析より dnBMAL1 マウス海馬では cAMP 情報伝達因子群、また、G タンパク質共役型受容体群の発現に異常を示すことが示され、定量的 RT-PCR 解析により、アデニル酸シクラーゼ 1(AC1)、AKAP5、ドーパミン受容体 D1R 及び D5R の mRNA 量が顕著に低下していることが明らかとなった。これらの結果に一致して、dnBMAL1 マウス海馬では cAMP 量も低下していることも明らかとなり、海馬時計機能の障害によって、D1/D5R 受容体により cAMP 産生を促進する情報伝達機能が低下していることが強く示唆された。そこで、cAMP 濃度上昇を誘導するロリプラム、また、D1/D5 受容体のアゴニストとアンタゴニストを用いた行動薬理学的解析により、社会的認知記憶課題を用いて海馬依存性記憶の想起に対するドーパミン-cAMP 情報伝達経路活性化と不活性化の影響を解析した。野生型マウスに対する D1/D5 受容体アンタゴニスト投与は ZT4(明期開始後 4 時間)における記憶想起には影響を与えなかったものの、ZT10 における記憶想起を選択的に阻害することが示された。一方、dnBMAL1 マウスに対するロリプラムあるいは D1/D5 受容体アゴニスト投与は ZT10 における社会的認知記憶想起の障害を改善することが示された。以上の解析結果から、海馬の時計機能はドーパミン D1/D5R-cAMP 情報伝達経路を介して記憶想起を制御すると結論した。

memory, dopamine, circadian

講演番号：2A24p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A24 会場

ビタミン B1 欠乏誘導性記憶障害の分子機構 -海馬における転写因子 CREB 情報伝達不活性化と CREB 活性化による記憶障害の改善

Down-regulation of CREB signaling pathway by Vitamin B1 deficiency and rescue of hippocampus-dependent memory deficits by activation of CREB

○辻 竜平、渡辺 玉絵、岸本 拓也、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○Ryuhei TSUJI, Tamae WATANABE, Takuya KISHIMOTO, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

ビタミン B1(B1)の重篤な欠乏は不可逆的な記憶障害を病態とするウェルニッケ・コルサコフ症候群を引き起こす。我々は B1 欠乏による記憶障害の性状とその発症メカニズムを解析してきた。現在までに、B1 欠乏から回復させたマウス(B1 欠乏回復マウス)では、海馬依存性記憶形成能力の障害が観察され、この記憶障害が不可逆的であることから、B1 欠乏回復マウスはウェルニッケ・コルサコフ症候群モデルとなることを示した。さらに、B1 欠乏により海馬の変性が誘導されることを示し、この変性が B1 欠乏による記憶障害の原因であることを示唆した。一方、現在までの我々の解析から転写因子 CREB は記憶形成に必須であることが示されている。本発表では、B1 欠乏による記憶障害と海馬変性の分子メカニズム解析を目的として、次世代シークエンサーを用いた海馬 RNA-Seq 解析を実施し、その結果の妥当性をマウス遺伝学的手法により検証した。野生型マウスに B1 欠乏飼料を 10 日間給餌し、この間 B1 アンタゴニストであるピリチアミンを連日腹腔内投与し、B1 欠乏状態を誘導した(B1 欠乏マウス)。その後、通常飼料を 3 週間以上給餌し、B1 欠乏状態から回復させた群を B1 欠乏回復マウスとした。B1 欠乏マウス並びに B1 欠乏回復マウス海馬のトランスクリプトーム解析の結果、最初期応答遺伝子群、グルタミン酸受容体群やスパイン制御因子群を中心とした記憶関連遺伝子群、さらに、炎症関連遺伝子群の発現に異常が起こっていることが示されたため、定量的 RT-PCR も併用して詳細な発現解析を行った。その結果、B1 欠乏回復マウス海馬において、神経活動依存的に CREB を介して発現誘導される最初期応答遺伝子 Arc、Npas4、Egr1、Egr2 の mRNA 量の有意な発現低下が観察され、同様に CREB によって発現誘導される脳由来神経栄養因子(BDNF)の exon4 からの転写も抑制されることが明らかになった。さらに、B1 欠乏マウスでは炎症性サイトカイン TNF α、抗炎症性サイトカイン TGF β1 の mRNA 量の有意な発現上昇が観察された。以上の結果から、B1 欠乏により海馬に炎症が誘導され、CREB 情報伝達系に継続的な障害が残り、記憶能力が低下する機構の存在が示唆された。この仮説を検討するため、我々が以前に作製した前脳特異的活性化型 CREB 変異体発現マウス(DIEDML マウス; J. Neurosci., 2011）に B1 欠乏を誘導し、その性状を解析した。その結果、この変異型マウスでは B1 欠乏を誘導しても海馬の変性が誘導されず、また、海馬依存性記憶障害も起こらないことが示された。従って、B1 欠乏が CREB 情報伝達系の減退を介して慢性的な記憶障害を誘導するのに対して、CREB 活性化により B1 誘導性の海馬の変性と記憶障害の進行を阻害、さらには、この障害を改善できるものと考えられた。

B1 deficiency, CREB, Hippocampus

講演番号：2A24p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A24 会場

海馬 TNFαによる恐怖記憶の想起制御

Regulation of fear memory retrieval by hippocampal TNFα

○高橋 翔平、福島 穂高、喜田 聡（東京農大院 ・ 農 ・ バイオ）
○Shohei TAKAHASHI, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA (Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

脳内炎症は統合失調症を代表とする精神疾患及び、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患の病態であることが示唆されている。神経炎症調節因子として知られるサイトカイン腫瘍壊死因子α（Tumor Necrosis Factorα；TNFα）は脳内ミクログリア等の免疫担当細胞から放出され、ニューロンに傷害を引き起こすと考えられている。さらに興味深いことに、ミクログリアにおける慢性的なTNFα産生阻害が恐怖記憶消去を促進することも示唆され（Yu et al., 2016)、トラウマ体験後の心的外傷後ストレス障害の発症に TNFαが関与する可能性が示されている。しかし、恐怖記憶制御に対する TNFαの役割の実態は未だ不明である。一方、記憶は固定化を経て不安定な短期記憶から安定な長期記憶へと変換される。その後、長期記憶が想起されると再び不安定な状態に戻り、再固定化を経て強化あるいは維持される。また、恐怖記憶を想起する時間が長くなると、恐怖反応を減弱させる消去が誘導される。現在までの我々のグループの解析から、海馬が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化、再固定化、消去に必要とされ、海馬は恐怖記憶制御において中心的な役割を果たすことが示されている。そこで、本研究では、海馬に TNFαを局所投与する行動薬理学的解析を用いて、恐怖条件づけ文脈記憶制御に対する海馬 TNFαの役割を解明することを試みた。条件付けチャンバー内でマウスに電気ショック（0.2mA、2 秒間）を与え（条件付け)、24 時間後にチャンバーに 5 分間戻し(テスト)、マウスがすくみ反応を示した時間の長さを指標に恐怖記憶を評価した。条件付け 6 時間前に海馬に TNFα（20 ng/side）を局所投与して恐怖記憶固定化に対する影響を解析した結果、条件付け 24 時間後の長期記憶に影響は観察されなかった。しかし、テスト 6 時間前に TNFαを局所投与した場合には、TNFα投与群はテストにおいて投与量依存的に溶媒群よりも有意に低いすくみ反応を示し、恐怖記憶の想起が阻害されたことが示された。一方、テスト時間を 30 分に延長して消去を誘導した場合には、TNFα投与は恐怖記憶の消去に影響を与えなかった。さらに、海馬に TNFαを局所した 6 時間後にオープンフィールド内で行動活性を評価した場合には、TNFα投与による行動活性の変化は観察されなかった。以上の結果から、海馬 TNFαは恐怖条件づけ記憶固定化、消去には作用せず、恐怖記憶想起を負に制御することが示唆された。

fear memory, retrieval, TNFα

講演番号：2A24p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A24 会場

カルパイン 10 (*CAPN10*) cDNA 配列における re-splicing 現象の解析

Impact of re-splicing propensity of CAPN10 cDNA on its function

○小野 弥子[1]、進藤 真由美[2]、土井 奈穂子[1]、反町 洋之[1] ([1]公益財団法人東京都医学総合研究所　カルパインプロジェクト、[2]公益財団法人東京都医学総合研究所　基盤技術研究センター)
○Yasuko ONO[1], Mayumi SHINDO[2], Naoko DOI[1], Hiroyuki SORIMACHI[1] ([1]Tokyo Metropolitan Insitute of Medical Science, [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

カルパインは主要な細胞内プロテアーゼの一種であり、ヒトでは 15 遺伝子にコードされる。これら遺伝子産物は、システインプロテアーゼドメイン(CysPc)を共通構造として持つ一方で、それぞれに特徴的なドメイン構造、発現分布様式、活性調節機構などが認められる。これにより、カルパインは、多様な生命現象に関与するプロテアーゼシステムを構築している。

CAPN10 はほぼ全ての組織に発現する分子種であり、2000 年に 2 型糖尿病(T2DM)の発症リスクを規定する要素の一つとしてその SNP が報告された。以来、分子機能が注目されているが、プロテアーゼ活性と T2DM との関係については不明なままである。また、様々なスプライシングバリアントが存在するが、タンパク質レベルでの構造機能相関などについては知見が不足している分子種である。

本研究では、3 種類の培養細胞に導入した *CAPN10*cDNA より想定外のタンパク質産物が得られることに着目し、その分子機構を解析した。その結果、ヒト及びマウス *CAPN10*cDNA 配列に非常に強力なスプライシングサイトが存在し、cDNA 転写産物が re-splicing を受けるということを見出した。この re-splicing 現象は、同定したスプライシングサイトへの変異導入によって抑制することが可能であった。これにより、培養細胞を用いたタンパク質発現実験系において、理論的に正しい CAPN10 タンパク質を得ることが初めて可能となった。この知見を利用し、カルパイン 10 のプロテアーゼ活性について、構造機能相関の解析を行った。

ヒト及びマウス CAPN10cDNA に見出した上記の re-splicing 部位は、他の脊椎動物 CAPN10 ホモログの遺伝子配列においても、高いスプライシングスコアを示す。このことから、CAPN10 のプロテアーゼ活性調節機構における新奇メカニズムの可能性と今後の検討課題について議論する。

calpain, splicing, re-splicing

発表責任者：小野弥子（ono-ys@igakuken.or.jp）

講演番号：2A24p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A24 会場

Ucp1 発現を制御する non-coding RNA の探索と機能解析

Search and function analysis of non-coding RNA controlling Ucp1 expression

○岩瀬 麻里[1]、酒井 章子[1]、瀬尾 茂人[2]、Tony Kuo[3]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,4]、Jheng Huie-Fun[1]、荒 武[1]、Paul Horton[3]、大里 直樹[2]、松田 秀雄[2]、河田 照雄[1,4]、後藤 剛[1,4]（[1]京大院農・食品生物、[2]阪大院情報・バイオ情報工学、[3]産総研・人工知能研究センター、[4]京大・生理化学研究ユニット）

○Mari Iwase[1], Shoko Sakai[1], Shigeto Seno[2], Kuo Tony[3], Haruya Takahashi[1], Wataru Nomura[1,4], Huie-Fun Jheng[1], Takeshi Ara[1], Horton Paul[3], Naoki Osato[2], Hideo Matsuda[2], Teruo Kawada[1,4], Tsuyoshi Goto[1,4] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dep. Bioinform Engn., Grad. Sch. Inform Sci & Technol., Osaka Univ., [3]Res. Ctr. Artificial Intelligence, National Inst Adv Industrial Sci & Technol., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】脂肪細胞はその機能により、余剰エネルギーを中性脂肪として蓄積する白色脂肪細胞と、中性脂肪を熱エネルギーに変換して消費する褐色脂肪細胞に大別される。この褐色脂肪細胞の高い熱産生はミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク質 1（UCP1）を介して行われる。近年、寒冷刺激に代表される特定の刺激によって、白色脂肪組織の中でも UCP1 を発現するベージュ脂肪細胞が誘導（褐色化）され、褐色脂肪細胞同様、全身のエネルギー消費に寄与することが明らかとなっている。当研究室では、寒冷暴露により褐色化を誘導したマウスの脂肪組織における転写産物の発現量変化を網羅的に解析してきた。その過程で、UCP1 発現と関連がある long non-coding RNA(lncRNA)の存在に着目した。本研究では褐色化が起きやすい鼠径部白色脂肪組織（iWAT）において寒冷刺激時に UCP1 と類似した発現変動を示した、lncRNA 2310069B03Rik(lnc-Rik)に着目し、UCP1 発現制御との関連を検討した。

【方法】7 週齢雄性 C57BL/6 マウスに寒冷暴露（4℃）後、経時的に精巣周囲白色脂肪組織（eWAT)、iWAT、肩甲骨褐色脂肪組織（BAT）を摘出し、lnc-Rik 及び Ucp1 の mRNA 発現量を測定した。次に、レトロウイルスを用いて lnc-Rik を強制発現した iWAT 由来培養細胞株を作製した。この細胞株を用いて脂肪細胞分化や褐色化に及ぼす影響を検討した。

【結果】lnc-Rik の mRNA 発現量に関して、eWAT では寒冷刺激による発現量の経時的な変化は見られなかった。一方で iWAT では寒冷 8 日目から、BAT では寒冷刺激による時間依存的に lnc-Rik 発現量の増加が見られた。また Ucp1 の発現量に関しては iWAT、BAT において寒冷刺激による有意な増加が見られたことから、寒冷刺激による UCP1 発現増加と lnc-Rik が類似の発現パターンを示すことが明らかとなった。lnc-Rik 強制発現株において分化マーカー（aP2、Adiponectin、Pparg）の mRNA 発現量を測定したところ有意差は見られず、Oil red O 染色や TG の蓄積量においても有意な差がなかったことから、lnc-Rik の強制発現は脂肪細胞分化に影響は低いと考えられた。また、Ucp1 および褐色脂肪細胞機能に重要な遺伝子（Pgc1a、Cpt1b）の mRNA 発現量が、lnc-Rik の強制発現により有意に抑制された。このことから、lnc-Rik は UCP1 発現制御をはじめとし、脂肪細胞の褐色化に抑制的に作用する遺伝子であることが考えられた。

【結論】lnc-Rik は UCP1 発現の制御に関与する遺伝子であると考えられた。

adipocyte, browning, cold exposure

講演番号：2A24p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A24 会場

光遺伝学的手法を用いた海馬による社会行動と社会的認知記憶制御機構の解析
Understanding mechanisms for regulation of social behavior and social recognition memory by hippocampus using optogenetics
○清田 啓輔、谷水 俊之、長葭 大海、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○ Keisuke KIYOTA, Toshiyuki TANIMIZU, Taikai NAGAYOSHI, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

対面した相手を記憶する社会的認知記憶は、円滑な社会行動を営む上で必須な能力である。マウスは社会行動を介して社会的認知記憶を形成する。一方、記憶は新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経て安定な長期記憶として保持される。我々は、社会的認知記憶の制御機構の解明を進め、社会的認知記憶固定化には前頭前野、前帯状皮質、扁桃体、海馬における新規遺伝子発現が必要であること、さらに、in silico 解析を用いた領野間の機能的結合性の評価により、前帯状皮質と扁桃体は社会行動発現に、一方、海馬と前頭前野は社会的認知記憶固定化により重要であることを示唆してきた。しかし、社会行動・記憶制御基盤の実態、すなわち、社会行動発現から社会的認知記憶に至るまでのこれら脳領域の役割とその役割の差異は未だ不明である。そこで、本研究では、光遺伝学的手法を用いて社会行動発現と社会的認知記憶制御に対するこれら脳領域の活性変動の影響を解析し、社会行動・記憶制御機構の解明を試みた。光感受性タンパク質アーキロドプシン T(ArchT)を前脳特異的に発現する遺伝子改変マウス(Tg)あるいは野生型マウスに幼若マウスを提示し、幼若マウスに鼻先を接触させる社会行動を観察した。幼若マウスを提示中に海馬ニューロンを光不活性化させた場合、Tg では野生型マウスに比べて幼若マウスに接触する時間が有意に短くなり、海馬不活性化は社会行動を抑制することが示唆された。一方、3 分間の幼若マウス提示後 5 分間海馬を光不活性化し、24 時間後に再度同一の幼若マウスを 3 分間提示すると、野生型マウスでは幼若マウスに接触した時間が有意に減少し、社会的認知記憶形成が認められたのに対して、Tg では幼若マウスに接触した時間の減少は観察されず、海馬不活性化による社会的認知記憶形成の障害が示された。さらに、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV9-αCaMKⅡ-ArchT-GFP)を海馬に注入し、海馬興奮性ニューロン特異的に ArchT を発現させたマウスで同様の解析を試みた場合においても、海馬光不活性化による社会行動の抑制と社会的認知記憶形成の障害が示された。以上の解析から、海馬は社会行動発現及び社会的認知記憶形成に必須であることが示された。

social recognition memory, hippocampus, optogenetics

講演番号：2A24p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A24 会場

海産養殖魚における TILLING 法を用いた新品種の作出技術
A new breeding approach with TILLING method in aquacultured fish
○黒柳 美和[1]、成田 篤史[2]、岸本 謙太[3]、片山 貴士[1]、二川 伸彦[2]、木下 政人[3]、吉浦 康寿[1]([1]水産機構瀬水研、[2]マリンテック、[3]京大院農)
○ Miwa KUROYANAGI[1], Atsushi NARITA[2], Kenta KISHIMOTO[3], Takashi KATAYAMA[1], Nobuhiko NIKAWA[2], Masato KINOSHITA[3], Yasutoshi YOSHIURA[1] ([1]FRA, [2]Marinetech Corp., [3]Kyoto Univ.)

【目的】植物では，TILLING(Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)法という突然変異を利用した技術が農作物の作出に導入されているが，養殖魚を含めた産業動物では実用化にいたっていない.そこで，我々はトラフグを対象として，本手法を用いて養殖魚における品種改良技術の開発を行った．次に，品種改良の実用化を目指して，大規模選抜システムや遠隔地との変異解析パイプラインを構築し，得られた有用変異体から次世代の作製を試みた．さらに，標的遺伝子への導入変異が引き起こすトラフグの表現型を早期に確認するため，ゲノム編集技術により作製した遺伝子欠損体を評価した.
【方法】TILLING 法は，一塩基変異を引き起こす化学変異誘発剤(ENU)の投与により，目的遺伝子に導入された変異を検出する方法である．一塩基変異検出には，高感度融解曲線解析(HRM)法を用いた．調べる標的遺伝子は，トラフグの高産肉性が期待できるミオスタチン(MSTN)とした．変異体を確実に獲得するため，ENU 誘発による *MSTN* 遺伝子への導入変異効率を調べた．実用化に向けて，大規模な飽和変異集団が作製可能な施設を有する企業と連携した．選抜は，まず，グループ(96-384)中の変異の有無を調べ，それらを個別飼育し，再度変異を検出することで変異個体(F_1)を特定した．獲得した有用変異体の精子を用いて，掛け合わせにより次世代(F_2)を作製し，遺伝変異の確認を行った．また，CRISPR/Cas9 法により MSTN 欠損体を作製し，外部形態及び体長・体重測定を行った.
【結果】トラフグ TILLING において，変異数から算出された導入効率は 1/297kb で，メダカ TILLING ライブラリー（1/350kb）と同等だった．この結果を踏まえ，50,974 尾の飽和変異集団を調べたところ，62 尾の MSTN 変異体を同定し，そのうち 3 尾の有用変異体(E275X;stop,C310Y,G312E)獲得に成功した．有用変異体の F_2 サンプルは，ENU による導入変異を遺伝的に受け継いでいた．また，ゲノム編集よって作製された MSTN 欠損体は背部と尾部の筋肉が大きく，10-20％体重が増加し，10％程度肥満度も高かった.
【考察】本研究は，トラフグにおける TILLING 法を用いた優良品種作出技術の確立を示し，遠隔地での大規模選抜システムが有効であることを実証した．また，ゲノム編集トラフグによる形質確認により，本法で作製された MSTN 有用変異体は，筋肉量が増える表現型を示す可能性が高いことが考えられた．本研究は，農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の受託により得られた成果です.

TILLING, Mutagenesis, Fish breeding

発表責任者：吉浦康寿（yoshiura@fra.affrc.go.jp）

講演番号：2A24p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A24 会場

ワモンゴキブリに RNA 干渉を誘導するための dsRNA の導入方法の検討

Investigation of method for dsRNA transfer to induce RNAi in Periplaneta americana

○宮田 恵多[1]、小澤 壮太[2]、長谷川 浩一[2]([1]中部大学生命健康科学部生命医科学科、[2]中部大学応用生物学部環境生物科学科)
○Keita MIYATA[1], Sota OZAWA[2], Koichi HASEGAWA[2] ([1]Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, [2]Department of Environmental Biology, College of Bioscience & Biotechnology, Chubu University)

RNA 干渉（RNA interference）は dsRNA（double stranded RNA）がきっかけとなって配列特異的に遺伝子の発現が抑制(ノックダウン: KD)される現象で、種々の生物で起こることが確認されており、種々のモデル生物で逆遺伝学的アプローチを行う際の非常に安定したツールの一つとなっている。近年では、昆虫が dsRNA を経口摂取すると RNA 干渉が起こること（environmental RNA 干渉：e-RNA 干渉）が報告され、害虫防除にこの現象を応用することに期待が高まっている。衛生および不快害虫として認められているワモンゴキブリ（*Periplaneta americana*）は、dsRNA を注射により直接体内へ導入することで RNA 干渉を誘導することが可能であることは明らかとなっているが、dsRNA の経口投与により RNA 干渉を誘導することが可能であるかは不明である。本研究では、ワモンゴキブリが e-RNA 干渉を示すか否を調べることを目的として、昆虫体表の色素沈着に関わる *ebony* 遺伝子に特異的な dsRNA をワモンゴキブリに注射あるいは経口投与し、dsRNA の長さによる RNA 干渉効率および dsRNA のデリバリーシステムに関する検討を行った。

ebony-dsRNA を注射により終齢幼虫の腹部から導入し、脱皮後の成虫を観察した結果、野生型に比べ体表が黒い表現型（*ebony*-KD 表現型）が現れた。さらに、50～500 bp の長さが異なる *ebony*-dsRNA を腹部注射により終齢幼虫に導入後、成虫の表現型を観察した結果、長鎖（100 bp 以上）の dsRNA を導入された成虫は *ebony*-KD 表現型が現れ、短鎖（50 bp 以下）の dsRNA が導入された成虫では野生型と同様の体表の色をしていた。これらのことから、ワモンゴキブリの *ebony*-KD 表現型は野生型に比べ体表が黒く、また、導入する dsRNA の長さが長いほど RNA 干渉が強く誘導されることが明らかとなった。次に経口投与による e-RNA 干渉誘導の有無を調べるため、500 bp dsRNA を経口的に終齢幼虫に投与し、脱皮後の成虫を観察したが、*ebony*-KD 表現型は現れなかった。dsRNA の体内消化液に対する安定性試験からワモンゴキブリ腸液中で dsRNA が分解されたことから、dsRNA を経口投与した場合、腸液に存在する dsRNA 分解酵素によって dsRNA が分解され、RNA 干渉を誘導することができないと考えられた。ワモンゴキブリ体内における dsRNA の分解を回避し、e-RNA 干渉を誘導するために、*ebony*-dsRNA を発現する大腸菌を調製し、終齢幼虫に給餌した結果、*ebony*-KD 表現型のように体表の一部分が黒くなった。以上の結果から、ワモンゴキブリに RNA 干渉を誘導する際には長鎖の dsRNA を導入することで高効率に誘導することができ、経口的な dsRNA の導入の際には dsRNA を腸内での分解から保護するデリバリーシステムの構築が必要であることが示唆された。

RNAi, ebony, Periplaneta americana

講演番号：2A25a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A25 会場

水酸化脂肪酸を構成脂肪酸として含有するトリアシルグリセロールの合成

Synthesis of triacylglycerol composing hydroxy fatty acids

岸野 重信[1]、外山 大地[1]、○嶋田 渉[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1]([1]京大院農、[2]日東薬品工業株式会社)
Shigenobu KISHINO[1], Daichi TOYAMA[1], ○Wataru SHIMADA[1], Yasunori YONEZIMA[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div.Appl.Life Sci.,Sch.Agric.,Kyoto Univ, [2]Nitto Pharmaceutical Industries)

【背景・目的】
乳酸菌における、リノール酸からオレイン酸への飽和化代謝にて生成される水酸化脂肪酸(10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, HYA)は、腸管バリア保護機能や、肝臓への脂肪蓄積抑制効果があることが確認されており、肥満予防に役立つ可能性が注目されている。しかし、遊離脂肪酸には特有の辛味があることから、HYA をトリアシルグリセロール(TG)の形態で生産することが望ましい。本検討では食品製造工程に使用可能なリパーゼを用いて、HYA を構成脂肪酸として含有する TG の生産について検討した。
【方法】
食品製造工程に使用可能なリパーゼ(粉末 4 種、固定化 1 種)に、植物油、遊離型の HYA を 30%程度含有する遊離脂肪酸混合物を加え、ヘキサン存在下でアシル基転移反応を行い、HYA を構成脂肪酸とする TG の生産量を測定した。いずれの粉末酵素にもアシル基転移活性が見られなかったため、樹脂への固定化を試みた。樹脂の種類と固定化方法の検討を行い、活性が見られた固定化酵素で繰り返し反応を行った際のアシル基転移活性を評価した。繰り返し反応を行っても活性の減少が少なかった酵素に関して、反応に用いる植物油の種類、添加する遊離脂肪酸混合物の比率、反応温度を検討した。
【結果・考察】
樹脂に固定化したリパーゼを反応に用いた際にのみアシル基転移活性が見られ、特に *Rhizomucour miehei* 由来のリパーゼを用いた場合に高いアシル基転移活性が認められた。このリパーゼを用いて、種々の検討を行った結果、反応後の TG における HYA 含有率は 35%程度まで向上した。
また、反応温度の検討の結果、反応温度の上昇による、繰り返し反応に用いた際の活性の減少が観測された。
以上の結果より、固定化リパーゼの遊離水酸化脂肪酸を基質とするアシル基転移活性が示された。また、この固定化リパーゼは反応温度と反応時間の調整により、繰り返し反応に適用できる可能性が示唆された。

functional fatty acid, hydroxy fatty acid, triacyl glycerol

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A25a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A25 会場

水酸化脂肪酸をアシル基として有するトリアシルグリセロールの脱酸方法の検討

Studies on deacidification method of triacylglycerol which has hydrated acyl group

○外山 大地[1]、岸野 重信[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]日東薬品工業株式会社)
○DAICHI TOYAMA[1], SHIGENOBU KISHINO[1], YASUNORI YONEJIMA[2], JUN OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ, [2]Nitto Pharmaceutical Industries)

【背景・目的】

腸内細菌の一種である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a によるリノール酸のオレイン酸への飽和化代謝経路が明らかになり、その代謝中間体である 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) が、腸管上皮バリアを保護する機能や、肝細胞への脂肪蓄積を抑制する機能など、健康に有益な効果を有することが確認されている。我々は、HYA の利用拡大をめざし、HYA をトリアシルグリセロール (TG) の形態へ変換する方法を構築している。この方法では、反応後の脂質混合液中に TG のほかに 70%程度の遊離脂肪酸が残存する。本研究では、この混合液の脂肪酸含有率を食用油脂として利用可能な 0.1%以下にすることを目的に、脂肪酸除去（脱酸）方法の検討を行った。一般的に脱酸処理に用いられる方法であるアルカリ精製は、脂肪酸含有率の高い脂質混合液には不適合である為、それ以外の脱酸処理方法について検討を行った。

【方法・結果】

TG 体を含む脂質混合液を乾固し、以下の 2 通りの脱酸処理の検討を行った。

① 陰イオン交換樹脂を用いた脱酸

陰イオン交換樹脂を用い、混合液中の脂肪酸のみを樹脂に吸着させることで分離除去を試みた。具体的には混合液を様々な濃度のエタノール水溶液と混合し、この溶液に一定量の陰イオン交換樹脂を 30 分間懸濁させた後、濾過により樹脂を除去して混合液を乾固させた。HPLC 分析で脂肪酸含有率を評価した結果、90%エタノール水溶液を用いた際に 1%以下の脂肪酸含有率を達成したが、樹脂量あたりの処理液量が少ないこと、樹脂の再生処理が煩雑であることから、実用化には不適と判断した。

② 液液抽出と膜分離の複合システムによる脱酸

エタノール水溶液への脂質の溶解性の違いを利用し、混合液中の脂肪酸のみを溶媒へ溶解させて PTFE 膜で分離することで除去を試みた。具体的には、様々な濃度のエタノール水溶液に混合液を加え、撹拌装置で液を撹拌して o/w エマルジョンを形成しながら PTFE 膜で濾過を行い、膜を透過せず残存した液を回収した。HPLC 分析で脂肪酸含有率を評価した結果、脂肪酸含有率は 2%以下になった。脱酸処理方法が簡便であること、膜の繰り返し利用が可能であることから、アルカリ精製と組み合わせることを前提として、本方法を最適な脱酸方法とした。

lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, deacidification

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A25a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A25 会場

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の基質特異性の解析
Analysis of substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase from the thermophile *Thermus thermophilus*

○小川 拓哉、SUWANAWAT Nittikarn、豊竹 洋佑、渡辺 文太、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Takuya OGAWA, Nittikarn SUWANAWAT, Yosuke TOYOTAKE, Bunta WATANABE, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (PlsC) は、リゾホスファチジン酸 (LPA) への脂肪酸アシル基の転移を触媒する。生成物であるホスファチジン酸は種々のリン脂質に共通した前駆物質である。細菌の生育温度と生体膜の脂肪酸組成は密接に関連しており、PlsC の基質特異性はそのような環境適応に貢献していると考えられる。

PlsC は膜タンパク質であり、最近まで活性な状態で PlsC の精製に成功した報告はなかった。このため、構造活性相関について知見が乏しかったが、2017 年、好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の PlsC の結晶構造が初めて報告された。本報告では、N 末端の２つの α–ヘリックスによって同酵素の飽和脂肪酸に対する選択性が厳密に制御されていることが提唱された。一方で、N 末端ヘリックスを１つしか持たない PlsC が *Thermus* 属やグラム陽性の細菌に広く見出される。本研究では、そのような酵素として好熱菌 *Thermus thermophilus* の PlsC (TtPlsC) に着目し、どのような基質特異性を示すか分析した。

【方法と結果】我々は前回大会において、*Shewanella* 属の低温菌由来の PlsC について精製および定量的な活性測定の方法を確立したことを報告した。本法を一部改変して、TtPlsC の精製に適用可能か試みた。*Escherichia coli* C43(DE3) 株を宿主とした TtPlsC の発現系を構築し、培養した菌体から膜画分を調製した。55 ℃ で加温するとともに界面活性剤を用いて TtPlsC を膜から可溶化したのち、Ni^{2+}-NTA カラムを用いてアフィニティ精製した。その結果、TtPlsC は 98% 以上の純度で得られ、収量は 0.27 mg/g of wet cells であった。

TtPlsC は熱処理および精製後も活性を保っており、palmitoyl-CoA および palmitoyl-LPA を基質として特性評価を行った。TtPlsC の至適反応条件は 80 ℃、pH 9.0 であり、このときの比活性は 5.4 ± 0.6 μmol/min/mg であった。また、熱に対して比較的安定であり、70 ℃ / 30 分の処理でも 33% の活性を保っていた。種々の脂肪酸アシル-CoA を用いて基質特異性を解析したところ、生理的な基質と考えられる *iso*-heptadecanoyl-CoA のほか、直鎖型や不飽和型の脂肪酸アシル-CoA にも反応性を示し、基質特異性が広いことが明らかになった。

lysophosphatidic acid acyltransferase, phospholipid metabolism, membrane protein

発表責任者：栗原達夫（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A25a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A25 会場

Pin1 阻害作用のある褐藻類ポリフェノールは PPARγレベルを低下させることでマウスの肥満を抑制した

Brown Algae Polyphenol, a Prolyl Isomerase Inhibitor, Prevents Obesity by Decreasing PPARγ Level

○岡田 拓実、鈴木 充子、生地 紘子、内田 隆史（東北大農）
○Takumi OKADA, Atsuko SUZUKI, Hiroko IKUJI, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】プロリン異性化酵素の一種である Pin1 は、タンパク質のアミノ酸配列中のリン酸化されたセリン又はスレオニンの次にプロリンが来る配列を特異的に認識し、アミノ酸のプロリンの二重結合部分をシス型からトランス型への構造変化を触媒することにより多くのリン酸化タンパク質の活性調節を行なっている。Pin1 は細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなどの重要な生命現象に関与するタンパク質を制御する。我々は脂肪細胞分化おいて Pin1 が重要な役割をすることを見出した。Pin1 の阻害剤も多く報告されているが、細胞毒性が強く実用化には至っていない。我々は天然物由来の Pin1 阻害剤の探索を行い、褐藻類ポリフェノール（Brown algae polyphenol ： BAP）が Pin1 の活性抑制をすることを発見した（1, 2)。forced feeding（強制投与）による褐藻類である kurome 粗抽出物(cBAP)の投与がマウスの肥満を抑制することを示すとともに、機能性食品等への応用を見据え、cBAP 添加高脂肪飼料を作製し *Ad libitum*（自由給餌）での抗肥満効果及び肝臓への影響も検証した。
【方法・結果】NIH3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞への分化実験を行った。脂肪細胞分化カクテル中に cBAP を添加し分化誘導を行ったところ脂肪分化が抑制された。4 週齢のオスのマウス（C57BL/6j）を普通飼料、高脂肪飼料、cBAP 添加高脂肪飼料を与え飼育した。2 日ごとに体重を測定し、1 週間ごとに飼料の摂食重量を計測した。62 日間計測を行った後、マウスを解剖し、解析した。高脂肪飼料を与えたマウスは通常飼料を与えたマウスと比較して体重が増加していたが、cBAP 添加によりその体重増加が抑制される傾向を示した。その抑制の程度は cBAP 添加飼料の摂食量と相関していた。マウスの肝臓での PPARγ発現量を western blotting によって解析したところ高脂肪飼料で発現量が増加したが、cBAP 添加により発現は通常飼料飼育程度に抑制されていた。
【考察】褐藻類ポリフェノールは Pin1 活性を抑制し、PPARγを介して脂肪細胞・肝臓細胞での脂肪分化・取り込みを抑制することを示唆している。
【謝辞】kurome 粗抽出物を供与していただいた長瀬産業に感謝する。
【文献】
1) Mori T. et al (2014) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78:5, 832-838
2) Atsuko S. et al (2016) PLoS ONE 11(12):e0168830

Pin1, PPARγ, Brown algae polyphenol

講演番号：2A25a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A25 会場

ヒスタミン分泌におけるジアシルグリセロールキナーゼγの機能解析及びその機能性食品への応用
Role of DGKγ in histamine release and its application to functional food
○倉橋 弘平[1]、菊永 佐紀子[1]、高岡 幸二[2]、上田 修司[1]、山之上 稔[1]、白井 康仁[1]（[1]神戸大農、[2]DSR）
○ Kohei KURAHASHI[1], Sakiko KIKUNAGA[1], Koji TAKAOKA[2], Shuji UEDA[1], Minoru YAMANOUE[1], Yasuhito SHIRAI[1] ([1]Kobe Univ., [2]DSR)

花粉症やアトピー性皮膚炎などに代表されるⅠ型アレルギーにはマスト細胞や好塩基球から放出されるヒスタミンが関与している。このヒスタミン分泌に重要なプロテインキナーゼ C（PKC）は、ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）によって間接的に抑制されていることが報告されている。そこで、前任者がマスト細胞のモデル細胞であるラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3 細胞）からのヒスタミン分泌に関与している DGK サブタイプを調べたところ、DGKγがヒスタミン分泌に関与していることを明らかにした。しかし、その詳細なメカニズムに関しては未だによくわかっていない。そこで本研究ではヒスタミン分泌における DGKγの詳細な機能を調べ、さらに DGKγを作用点とした抗ヒスタミン成分を有する食品成分を探索することを目的とした。

まず、マウス骨髄由来マスト細胞（BMMC）に阻害効果の異なるDGK阻害剤を処置し、β-hexosaminidase assayによりヒスタミン分泌を評価した。その結果、ヒスタミン分泌はDGKγ阻害剤で抑制され、その阻害効果は阻害剤の強さと正の相関があった。さらにDGKγノックアウト（KO）マウスからBMMCを取り出し野生型マウス由来のBMMCと比較したところ、ヒスタミン分泌は有意に抑制された。また、野生型とDGKγKOマウスを用いて鼻炎モデルマウスを作製したところ、鼻炎に伴う鼻の引っ掻き行動の回数がDGKγKOマウスでは減少していることがわかった。以上のことから、DGKγは生体内でもヒスタミン分泌やアレルギーにおいて重要な働きをしていることが確認された。

次にヒスタミン分泌におけるDGKγの詳細なメカニズムを明らかにするために、野生型及びDGKγKOマウス由来のBMMCを用いてヒスタミン分泌関連分子のリン酸化や細胞内カルシウム動態を調べた。その結果、ヒスタミン分泌のシグナル伝達経路においてDGKの上流に位置するホスホリパーゼCγ（PLCγ）のリン酸化量については大きな変化は認められなかったが、DGKγKOマウスではカルシウム流入量が減少していることが分かった。以上のことから、DGKγは少なくともカルシウム流入を促進することでヒスタミン分泌を正に制御していることが示唆された。

最後に DGKγを作用点とする抗ヒスタミン作用を有する天然機能成分の探索を目的に様々な植物抽出エキスを処置し、野生型と DGKγKO 由来の BMMC でヒスタミン分泌抑制効果を比較した。その結果、ボタンピの抽出物が DGKγを介してヒスタミン分泌を抑制することが示唆された。

現在、DGKγがカルシウム流入を制御するメカニズムや鼻炎モデルマウスに対するボタンピの効果について検討中である。

mast cell, lipid kinase, calcium influx

発表責任者：倉橋　弘平（i-kohei6@outlook.jp）

講演番号：2A25a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A25 会場

海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類からの新規リパーゼの探索

Search for novel lipases from marine microorganism Labyrinthulea

○石橋 洋平[1]、青木 敬祐[1]、林 雅弘[2]、沖野 望[1]、伊東 信[1] ([1]九大院農、[2]宮大)
○Yohei ISHIBASHI[1], Keisuke AOKI[1], Masahiro HAYASHI[2], Nozomu OKINO[1], Makoto ITO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyazaki Univ.)

リパーゼは脂肪酸製造や油脂加工に活用される有用な脂質加水分解酵素である。細胞内に脂質を蓄積する油糧微生物は分泌型を含む多様なリパーゼを生産することが知られる。ラビリンチュラ類はドコサヘキサエン酸（DHA）を含むトリアシルグリセロール（TG）を生合成し、細胞内の油滴に蓄積する海洋性の油糧微生物である。極めて高い脂質蓄積能、特殊な脂質組成を有するこの真核単細胞生物には独自の脂質代謝酵素が備わっていると考え、近縁微生物との比較ゲノム解析によりラビリンチュラ類特有の脂質代謝関連遺伝子を探索した。その結果、ラビリンチュラ類 Aurantiochytrium limacinum のゲノム配列中にリパーゼの活性モチーフを有する未知の遺伝子が見いだされた。この遺伝子（Protein ID:145138）のアミノ酸配列の N 末端側の 250 残基はこれまでに報告例のない新規配列であった。この遺伝子を A. limacinum に発現させ、局在を検証した結果、培地中に放出される分泌型酵素であることが判明した。培地画分から精製したリコンビナント酵素を用いて基質特異性を検証した結果、TG のみならずジアシルグリセロール（DG)、モノアシルグリセロール（MG)、リン脂質であるホスファチジルコリン（PC）を効率よく分解する新規リパーゼであることが分かった。TG の sn-1、２、３に結合している脂肪酸はいずれも同程度の効率で切り出されたことから、本酵素はグリセロ骨格の結合部位に対する位置特異性がないことが示された。本酵素の諸性質を検証した結果、エタノールやメタノールなどの有機溶媒に対する耐性、塩に対する耐性が高く、pH 安定性に優れたリパーゼであることが分かった。本酵素は海洋中に放出される分泌型リパーゼである為、過酷な環境においても機能を失わないような構造を有していると考えられる。本研究で見いだされた新規リパーゼは様々な脂質に対する反応効率が高く、様々な条件下でも機能し得る耐性能を示しており、油脂産業への利用が期待される。

Lipase, PUFA, Labyrinthulea

講演番号：2A25a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A25 会場

リン脂質の改変を目指した *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株由来新規ホスホリパーゼ A_1 の性質決定

Characterization of a novel phospholipase A_1 from *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T for functional modification of phospholipid

○田中 秀典[1]、齋藤 遼[1]、古谷 洋人[1]、辻本 善之[1]、鶴岡 直樹[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1]([1]京府大院生命環境、[2]産総研)
○ Hidenori TANAKA[1], Ryo SAITO[1], Hiroto FURUYA[1], Yoshiyuki TSUJIMOTO[1], Naoki TSURUOKA[2], Yasushi SHIGERI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【背景・目的】　リン脂質を加水分解するホスホリパーゼ（PL）は油脂の精製や、機能性リン脂質や乳化性に優れたリゾリン脂質の製造等の脂質改変に利用されている。しかし、宗教や病原性の問題、そして PL が細胞膜を破壊することによる異種発現系での大量調製の困難さのため、産業利用可能な酵素は限られている。そのため、安定性に優れ高い位置選択性を有する安価で大量調製可能な代替酵素が求められている。そこで、我々は好熱性細菌に注目し、アシドロコンポスト（酸性・高温の堆肥）より *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株を単離した*。B157^T 株はリン脂質の *sn*-1 位に選択性の高い加水分解酵素ホスホリパーゼ A_1 (PLA_1）を細胞外に分泌する。この PLA_1 は C 末端側に pro 配列を持つ活性のほとんどない不活性型として分泌された後、細胞外で pro 配列がプロセシングされて活性化される。そこで、不活性型 PLA_1 (inactive PlaA）を大腸菌で大量発現させた後に、*in vitro* でプロセシングを行うことで活性型 PLA_1 (active PlaA）を調製し、その性質を決定することとした。

【方法・結果】　B157^T 株由来の inactive PlaA をコードする遺伝子を pET-11a に組み込み、*Escherichia coli* Rosetta (DE3）で発現を行った。その結果、37°C での IPTG 誘導によって可溶性画分に inactive PlaA が大量に発現した。その無細胞抽出液に対する 80%硫安沈殿、熱処理（60°C)、2 種のクロマトグラフィー（DEAE-cellulose と DEAE-sepharose）によって inactive PlaA を電気泳動的に均一に精製した。次に、精製 inactive PlaA を市販の proteinase K と反応させることで pro 配列を切断・分解し、CM-cellulose を用いることで、active PlaA の精製標品を得た。Active PlaA とホスファチジルコリン（PC）を pH 7, 60°C で反応させると PC は分解され lyso PC (LPC）と遊離脂肪酸 (FFA）が生じ、その後 LPC も分解されて glycero PC (GPC）と FFA が生じた。酵素反応（pH 7, 60°C, 16 h）後に、さらに PC を加えても active PlaA は有意な活性を保持したため、高い熱安定性が示された。また、50% MeOH 存在下での酵素反応において、PC は分解され、FFA に加えて脂肪酸メチルエステル（FAME）も生成されていた。このことは、本酵素が高い有機溶媒耐性を有するとともに、MeOH 存在下で PC から FAME に変換するエステル交換活性をも有することを示している。現在、active PlaA の諸性質を明らかにしており、active PlaA を用いた機能性リン脂質の改変を試みている。

Int J Syst Evol Microbiol,**66**, 2684-2690 (2016)

Phospholipase A_1, Thermophile, FAME

講演番号：2A25a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A25 会場

コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性改変と基質認識機構の考察
Substrate specificity modification and substrate recognition mechanism of choline lysoplasmalogen specific phospholipase D

○小山 貴之[1]、成田 悠理[1]、酒瀬川 信一[2]、村山 和隆[3]、杉森 大助[1] ([1]福島大、[2]旭化成ファーマ、[3]東北大院医工)
○ Takayuki OYAMA[1], Yuri NARITA[1], Shinichi SAKASEGAWA[2], Kazutaka MURAYAMA[3], Daisuke SUGIMORI[1] ([1]Fukushima Univ., [2]Asahikasei Pharma, [3]Tohoku Univ.)

【研究背景】プラズマローゲン(Pls)は、*sn*-1 位にアルケニルエーテル結合を持つリン脂質で脳細胞の酸化防止という重要な役割を担っている。近年、Pls がアルツハイマー型認知症や冠動脈疾患等バイオマーカーとなることが報告され、血中 Pls を測定することによりこれら疾患の早期発見が期待されている。これまでに、我々はコリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D(LyPlsCho-PLD)を発見し、速度論解析等により本酵素が基質ヘッドグループと *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖を識別している可能性が高いと結論付けた。しかしながら、酵素のどの部位が基質認識に関与するのか依然として不明である。本研究では基質認識メカニズム解明とともに所望の基質特異性を持つ酵素に改変することを目指し、部位特異的変異解析ならびに速度論解析を行った。
【方法】酵素の立体構造モデルと基質類似化合物とのドッキングシミュレーション解析の結果から、酵素の活性中心付近に位置し、基質の *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖と相互作用すると考えられる Asn173 と基質のヘッドグループ認識に関与すると考えられる Phe211, Trp282 に着目し、部位特異的にアミノ酸置換を行った。各変異体は pET24a と BL21(DE3)を用いて発現させ、CFE から HisTrap カラムで各変異体酵素を単一バンドまで精製した。基質特異性が顕著に変化した変異体に関して速度論試験を行った。
【結果と考察】基質特異性試験の結果、W282A, R はいずれも Wild type (WT)の基質特異性とは大きく異なり、本来の基質である LyPlsCho に対する活性を完全に消失したが、アルキルエーテルリン脂質である Lyso-PAF に対する活性はわずかに残存していた。一方、W282M, G 変異体の基質特異性は WT と同様であったが、LyPlsCho と Lyso-PAF に対する活性が著しく低下した。N173A, I, Q 変異体に関しては、いずれも基質特異性が逆転する(Lyso-PAF > LyPlsCho)という興味深い結果が得られた。さらに、F211 変異体については LyPlsCho に対する活性が大幅に低下し、アミノ酸側鎖の小さい Ile や Leu に置換すると Lyso-PAF に対する活性が著しく増加し、側鎖のかさ高い Tyr や Trp に置換すると Lyso-PAF に対する活性が低下することがわかった。また変異体 F211I, L, Y に関しては、比活性を低下させずに、基質特異性を大きく改変できた点で注目すべき結果である。以上の結果より、N173, F211 は *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖の認識に深く関与し、W282 は基質結合に関与していると考えられる。本発表では速度論試験より得られた知見とともに基質認識に関与する各アミノ酸の機能について考察する予定である。

Phospholipase D, substrate specificity, Lysoplasmalogen

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：2A25a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A25 会場

Engineered phospholipase D with high specificity for lysophospholipids and diacylphospholipids with short-chain *sn-2* groups

○Jasmina DAMNJANOVIC, Hideo NAKANO, Yugo IWASAKI (Nagoya University)

To establish efficient synthesis of otherwise difficult-to-obtain bioactive phospholipids (PLs) we have designed several synthetic routes that utilize our engineered phospholipase D (PLD) enzymes to introduce bulky or branched polar heads, e.g. inositol, glucose or threonine, into the PL backbone. The current research aims to create a PLD with high specificity for lyso-PLs and diacyl-PLs with short-chain *sn-2* acyl groups. Such PLD would enable simple and specific detection of lyso-PLs in various specimens, as well as enzymatic synthesis of some bioactive PLs, such as cyclic phosphatidic acid (cPA) from crude samples containing mixture of diacyl- and lyso-PLs.

Based on the crystal structure of *Streptomyces* PLD (2ze9), W166 was selected for saturation mutagenesis since it interacts strongly with *sn-2* acyl group of the PLs. The obtained variants were screened using two substrates, dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) and lyso-oleoyl-phosphatidylcholine (lyso-OPC). All variants, except W166K and W166R, either utilized both or none of the substrates. W166K and W166R reacted on lyso-OPC, but not on DOPC. After overexpression and purification, the two variants and the wild type PLD were reacted with PCs having increasing length of the *sn-2* acyl group, namely, oleoylacetyl-PC, oleoylhexanoyl-PC, oleoyldecanoyl-PC, oleoylmyristoyl-PC and DOPC. Activity sharply decreased with increase of the *sn-2* acyl group length in W166R and, to a less extent in W166K PLD. While the wild type PLD hydrolyzed all of the PCs with efficiency of more than 90% (calculated as yield of the hydrolytic product), W166R and W166K hydrolyzed oleoylacetyl-PC with comparable efficiency, however, DOPC with nearly 0% and 25%, respectively.

The newly obtained PLD with high specificity for lyso-PLs and diacyl-PLs with short-chain *sn-2* acyl groups, W166R, has a strong potential for use in specific detection of lyso-PLs, as shown by the competitive assay done under the varying molar ratios of DOPC and lyso-OPC, where the enzyme preferably reacted on lyso-OPC. In addition, W166R acquired some activity in the hydrolysis of glycerylphosphorylcholine, the property absent in the wild type PLD. W166R's potential in synthesis of cPA from DOPC has been demonstrated in the 2-enzyme system with PLA_2, where PLA_2 catalyzes the first step to convert DOPC to lyso-OPC, and W166R then converts lyso-OPC to cPA. This was not possible in the same system with the wild type PLD due to its high affinity to DOPC and, thus, competition with PLA_2 for this substrate.

phospholipase D, substrate specificity, *sn-2* acyl group length specificity

発表責任者：IWASAKI Yugo（iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A25a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A25 会場

天然ゴム生合成機構におけるゴム粒子の重要性

Rubber particle is a key factor for *cis*-prenyltransferases to exhibit natural rubber biosynthetic activity

石井 智樹[1]、末永 美樹[1]、山下 哲[2]、山家 史大[1]、和氣 駿之[1]、小島 幸治[1]、山口 晴彦[3]、井之上 ゆき乃[3]、伏原 和久[3]、中山 亨[1]、○高橋 征司[1]([1]東北大院工、[2]金沢大理工、[3]住友ゴム工業)
Tomoki Ishii[1], Miki Suenaga[1], Satoshi Yamashita[2], Fumihiro Yanbe[1], Toshiyuki Waki[1], Kouji Kojima[1], Haruhiko Yamaguchi[3], Yukino Inoue[3], Kazuhisa Fushihara[3], Toru Nakayama[1], ○Seiji Takahashi[1] ([1]Grad. Sch. Eng, Tohoku Univ., [2]Col. Sci. & Eng., Kanazawa Univ., [3]Sumitomo Rubber Industories LTD.)

パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）のラテックスより生産される天然ゴム（NR）は優れた物性を有しており，化石燃料由来の多様な合成ゴムが開発されている現代においてもゴム工業に不可欠な天然材料である．ラテックスは乳管細胞の細胞質に相当するが，その中で NR は脂質一重膜に覆われたゴム粒子（rubber particle, RP）として存在している．NR は分子量 10^6 以上にも及ぶ超長鎖の *cis*-1,4-ポリイソプレノイドであるが，そのω末端には数個の *trans*-イソプレン単位の存在が確認されている．この構造は，全ての真核生物が普遍的に有する糖キャリア脂質であるドリコール（$C_{75\sim120}$ 程度）と類似であるため，NR とドリコールの生合成機構の関連性が示唆される．一般的に，ドリコールの前駆体（デヒドロドリキル二リン酸)は，全 *trans* 短鎖プレニル二リン酸であるファルネシル二リン酸(FPP)に対し，イソペンテニル二リン酸（IPP）が連続的に *cis* 型重合することで生合成されるが，その反応は ER 膜局在型の *cis* 型プレニル鎖延長酵素（cPT）によって触媒される．NR 生合成活性は RP から検出されていたため，ER 膜上に存在する cPT によって IPP が重合し，伸長する疎水性ポリイソプレン鎖が脂質二重層内に蓄積することで NR を含む RP として出芽するというモデルが想定されていた．パラゴムノキの cPT 相同遺伝子 *HRT1* は，大腸菌異種発現系では活性を示さず，酵母で異種発現させた際は重合活性を示すものの，C_{100} 程度の生成物しか与えないため，反応場としての RP の重要性が想定された．そこで我々は，コムギ胚芽抽出物を利用した無細胞タンパク質発現系によって，界面活性剤でタンパク質を極力除去したパラゴムノキ由来 RP（WRP）上へ目的タンパク質を発現させる系を構築した．それにより導入された HRT1 は，FPP を開始基質として分子量 10^6 以上にも及ぶ NR サイズのポリイソプレノイドを生合成する活性を示し，初めて NR 生合成の機能同定に成功した．NR 生合成における反応場としての RP の重要性を検証するため，レタス等の他の NR 生合成植物由来 cPT をパラゴムノキ WRP に導入したところ，やはり NR と同等のポリイソプレノイド合成活性を示した．これまでの我々の cPT 比較機能解析から，真核生物の長鎖型 cPT の生成物鎖長は，伸長するポリイソプレン鎖の疎水的空間への収容様式と酵素触媒回転効率で決定されると推定していた．そこで，出芽酵母とヒトの cPT（DedolPP 合成酵素）を WRP に導入したところ，やはり HRT1 と同様の分子量分布を示すポリイソプレノイドを生合成した．また，中鎖型 cPT を導入した場合でも，NR サイズの生成物を与えた．以上の結果は，NR を生合成するために特殊化した“NR 生合成酵素”が存在するわけではなく，cPT が RP 上に適切に導入されることが NR 生合成の鍵であることを示唆している．

natural rubber, prenyltransferase, isoprenoid

発表責任者：高橋征司（takahasi@seika.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A25a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A25 会場

部位特異的変異導入によるヒト RNase H2 の基質特異性の改変

Modification of substrate specificity of human RNase H2 by site-directed mutagenesis

○兒島 憲二[1,2]、馬場 美聡[1]、西村 拓人[2]、杉浦 拓也[2]、滝田 禎亮[1,2]、上原 了[3]、Crouch Robert[3]、保川 清[1,2] ([1]京大院農、[2]京大農、[3]米国国立衛生研)

○ Kenji KOJIMA[1,2], Misato BABA[1], Takuto NISHIMURA[2], Takuya SUGIURA[2], Teisuke TAKITA[1,2], Ryo UEHARA[3], Robert CROUCH[3], Kiyoshi YASUKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]NICHD, NIH)

【目的】リボヌクレアーゼ H（RNase H）は，RNA/DNA ハイブリッド（R/D）の RNA を加水分解する酵素である．RNase H2（RH2）は，二本鎖 DNA に 1 個だけ埋め込まれたリボヌクレオチド（R）の 5’側を切断する活性（活性 A）と，R/D の連続する R を切断する活性（活性 B）を有する．近年，DNA 複製時に DNA ポリメラーゼによりゲノムに R が取り込まれること, そして RH2 がそれらを除去しゲノム安定性維持に寄与していることが明らかになった．また，転写時に生じる R ループ（R/D と一本鎖 DNA から成る 3 本鎖構造）のプロセシングの異常はゲノムの不安定化につながると考えられ, RH2 がこれを解消していることが明らかになった．RH2 の 2 種類の酵素活性がそれぞれ生体内でどのような表現型に対応するのかを詳細に明らかにするため，活性 B を保持したまま，活性 A が消失した *Saccharomyces cerevisiae* RNase H2 変異体が作製された（*Nucleic Acids Res.* **41**, 3130–3143（2013））．本研究では，それとは反対の基質特異性を有するヒト RH2（hRH2）変異体の作製を目的とした．

【方法】6 残基のヒスチジンを N 末端に付加した hRH2 のサブユニット A, B, および C を大腸菌 BL21（DE3）でポリシストロニックに発現させた．菌体内可溶性画分から HiTrap Heparin HP カラムおよび HisTrap HP カラム（ともに GE Healthcare）を用いて hRH2 を精製した．hRH2 活性測定の基質は，3’-フルオレセイン修飾 RNA（5’-gaucugagccugggagcu-3’）と 5’-Dabcyl 修飾 DNA（5’-AGCTCCCAGGCTCAG ATC-3’）から成る R/D（18R）, および 1 個の R を含む 3’-フルオレセイン修飾 DNA（5’-GATCTGAGCCTG GGaGCT-3’）と 5’-Dabcyl 修飾 DNA から成る 1R を用いた．反応時間に対して酵素反応液の蛍光（励起 490 nm，蛍光 515 nm）が直線的に増大する部分の傾きを各基質に対する加水分解活性とした．

【結果】hRH2（PDB: 3P56）と基質の複合体の立体構造モデルを作成したところ，加水分解を受けるホスホジエステル結合の 5’側ヌクレオチドの糖の部分に Val143 が近接していた．そこで，Val143 をかさ高い側鎖を有するアミノ酸に置換することで，18R 基質のリボースの 2’-OH 基と立体障害を引き起こし，基質特異性を改変できると考えた．Val143 を Leu，Ile，Phe，Tyr，Trp，Asn，Gln，Asp，Glu，Lys，Arg，および His に置換した変異体を調製し，1R および 18R に対する加水分解活性を測定した．分岐アミノ酸や芳香族アミノ酸に置換した変異体では野生型の 4%以上の活性を保持したが，荷電性アミノ酸に置換した変異体では野生型の 1%以下に活性が減少した．Tyr または Trp に置換した変異体では，1R に対する加水分解活性は野生型の 30%，18R に対する加水分解活性は 5%であり，野生型に比べて 18R より 1R を好むように基質特異性が変化した．

RNase H2, genome stability, R loop

講演番号：2A25p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A25 会場

リンゴ酸デヒドロゲナーゼの不安定化による比活性の向上

Improvement of specific activity dy destabilization of Malate dehydrogenase.

○下澤 勇弥、西矢 芳昭 (摂南大学)
○Yuya Shimozawa, Yoshiaki Nishiya (Setsunan Univ.)

【目的】リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）は、AST 測定用試薬などの臨床検査薬に幅広く応用可能な酸化還元酵素であり、既に数種の生物由来の MDH が実用化されている。それら MDH の中でも、好熱菌として知られる *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH（gs-MDH）は、他生物由来のものと比べ基質親和性が非常に高いことから、検査薬用酵素として優れたている。さらに、gs-MDH は免疫検査における標識酵素としても応用が期待できる。しかし、熱安定性が高いため至適温度も高く、臨床検査薬の測定法が定める反応温度である 30℃では本来の活性が発揮できない。そこで、部位特異的アミノ酸置換変異によって、30℃における反応速度の向上を試みた。
【方法・結果】gs-MDH の立体構造から変異箇所をデザインするため、活性部位の可動ループが開いた Open 構造と基質の結合により可動ループが閉じた Closed 構造の二つのコンホメーションをホモロジーモデリングによって予測した。これらの構造から、Open および Closed 構造のコンホメーション変化が反応に重要であることが推察された。そこで、Closed 構造における可動ループ付近に存在する 218 番目の Gly 残基を、側鎖の大きい Phe や Tyr、Trp に置換することで、意図的に Closed 構造を不安定化させ、反応後迅速に Open 構造に移行することを狙い、変異体（G218F/Y/W）を作成した。その結果、30℃付近の低温における反応速度が野生型と比べ 2.6～3.7 倍に上昇した。
【結論】本実験結果から、得られた変異体は低温における反応速度が大きく向上した。これにより、臨床検査ではより迅速な測定が可能となる。また同様に、標識酵素としての応用も十分に期待できる。

Malate dehydrogenase, protein engineering, destabilization

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2A25p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A25 会場

Aquificae-type のヒドロゲナーゼの機能解析
Function of the Aquificae-type hydrogenase

○河野 岳、亀谷 将史、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科）
○Gaku Kono, Masafumi Kameya, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* は Aquificales 目に属する細菌であり、16S rRNA 配列に基づく系統解析により進化的に最も古い起源を持つ菌群に属すると考えられている。本菌は絶対独立栄養性であり、エネルギー源として水素またはチオ硫酸を利用し、還元的 TCA 回路によって二酸化炭素を炭素源とする。水素をエネルギー源とする代謝ではヒドロゲナーゼが重要な役割を果たしているが、本菌のゲノム上には 5 つのヒドロゲナーゼがコードされている。その中の 1 つである Hup2 複合体は Aquificae-type のヒドロゲナーゼに分類される。このタイプのヒドロゲナーゼは Aquificales 目に属する細菌に特徴的なものであり、その機能は他の類縁菌も含めて未だ解明されていない。過去に *H. thermophilus* の *hupL2* 破壊株が取得されているが、その株は水素をエネルギー源とした条件では生育能を示さず、Hup2 複合体の生理学的重要性が示唆されていた。そこで本研究では、*H. thermophilus* のヒドロゲナーゼである Hup2 複合体の機能解明を主な目的とした。
【方法・結果】(1)本菌の細胞破砕液中にこれまで水素依存の NAD^+還元活性が確認されていたが、その反応を触媒する酵素は同定されていなかった。そこで過去に取得されてきた本菌の 4 種類のヒドロゲナーゼ破壊株を用いて、酵素活性測定を行った。その結果、*hupL2* 破壊株でのみ水素依存的な NAD^+還元活性が消失した。*hupL2* 破壊株が水素をエネルギー源とした培養条件下で生育能を失う原因はこの NAD^+還元活性の欠損であり、本菌の水素酸化代謝に必須の活性であると考えられた。(2)各ヒドロゲナーゼ破壊株及び野生株の細胞破砕液を用い、BN-PAGE で泳動後、TTC 還元ヒドロゲナーゼ活性染色を行うことで、各ヒドロゲナーゼのバンドの位置を同定した。(3)Hup2 複合体による NAD^+還元活性を確認するため、各種精製用カラムを用いて酵素の精製を試みた。NAD^+還元活性が見られた精製画分を前述の BN-PAGE および TTC 還元活性染色に供することで、NAD^+還元活性に関わるヒドロゲナーゼの精製を進めている。(4)Hup2 及びその他のヒドロゲナーゼに精製用タグを付与した本菌の変異株を作製し、ヒドロゲナーゼ複合体の精製を試みた。His タグを付与した株においては非特異的なタンパク質の影響のためか、精製が困難であった。そこで現在、strep-tagⅡを付与した株を作製し、更なる解析を進めている。

以上の結果から、本菌の Hup2 複合体が NAD^+の還元反応に関わっていること、また類縁菌で機能未知であった Aquificae-type のヒドロゲナーゼも同様の生理学的機能を果たしている可能性が示唆された。

hydrogenase, Aquificae, NAD

講演番号：2A25p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A25 会場

ヘモグロビンの新規フラボノイド変換活性の発見

Discovery of a novel flavonoid-converting activity of hemoglobin

○永久保 利紀、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○Toshiki NAGAKUBO, Takuto KUMANO, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】

がんや心疾患などの慢性疾患の増加は、世界規模の健康問題である。疫学的な調査結果は、これらの慢性疾患に対するフラボノイドの予防効果を裏付けており、その効果がフラボノイドの抗酸化作用や種々の酵素に対する阻害作用に起因することも明らかにされてきている。しかし、ヒト体内におけるフラボノイドの代謝経路は、十分に理解されているとはいいがたい。一方で、フラボノイド代謝産物が独自の生理活性を発揮し、フラボノイドの生理活性の一部を担っていることも報告されている。したがって、ヒト体内における未知のフラボノイド代謝産物や代謝酵素の同定は、フラボノイドの有用な生理活性を理解する上で必要不可欠である。

【結果】

本研究では、ヒトのモデル動物であるブタを用いて、フラボノイドを変換する新規酵素の探索を試みた。具体的には、ブタ臓器由来無細胞抽出液とフラボノイドを含む反応液をインキュベートし、高速液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）により、フラボノイドに由来する反応産物の検出を試みた。その結果、ブタ肝臓由来の無細胞抽出液が、CoA の存在下で 7,8-dihydroxyflavone（7,8-DHF）を新規化合物に変換する活性を有することを見出した。この変換反応を触媒する酵素を高純度に精製し、アミノ酸配列の同定を行ったところ、本酵素がヘモグロビン（Hb）であることが分かった。次に、質量分析や核磁気共鳴分光法（NMR）を用いた構造解析、基質特異性の検討等により、Hb が、(i) CoA を pantetheine と 3'-phospho-ADP に加水分解し、(ii) CoA の分解産物である pantetheine（あるいは glutathione や cysteine 等のチオール）を-SH 基を介してフラボノイドに付加する、前例の無い２段階反応を触媒することを明らかにした。Hb の補因子ヘムを一酸化炭素で不活性化することで反応②のみが阻害されたことから、反応①が Hb のポリペプチド鎖部位において触媒されることも明らかにした。また、この２段階反応を触媒する活性はヒト由来 Hb にも存在した。

Hb は普遍的に存在する酸素運搬タンパク質だが、上記のフラボノイド変換酵素としての活性に関する報告はこれまでに一切無い。以上の結果は、Hb の新たな生理学的役割の発見につながる可能性がある。

Flavonoid, Hemoglobin, CoA

講演番号：2A25p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A25 会場

Molecular insights into the genesis and evolution of aromatic hydrocarbon catabolic pathway in Thermus oshimai JL-2

○ Joydeep CHAKRABORTY, Mickael GEGOUT, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

Objectives: *Thermus oshimai* JL-2, an aerobic thermophile isolated as a nitrate reducer from the Unites States Great Basin hot springs[1], bears a unique cluster of oxidoreductase genes located within a 0.27 Mb megaplasmid, pTHEOS01. Comparative genomics have indicated that the cluster is very much conserved among few Thermales but does not show any resemblance with any known catabolic gene cluster in other bacteria. Based on gene sequence homology and synteny, the cluster has been hypothesized as a newly assembled set of genes (acquired by lateral transfer from taxonomically diverse members), still under the process of evolution towards a functional operon for degradation of carboxylated arenes like *p*-hydroxybenzoate (PHB) and vanillate (VAN). The present research aims at establishing the hypothesis by biochemical and molecular characterization of the pathway intermediates and genes involved in individual catalytic steps.
Methods and Results: Analysis of the genome sequence of JL-2 using MetaCyc[2] resulted in identification of three genes related to the degradation of protocatechuic acid, which were scattered among the chromosome as well as in a catabolic cluster present in pTHEOS01. The cluster was further analyzed to identify any possible operon(s) based on gene order and intergenic spaces. This led to identification of two putative transcriptional units around the locus, which did not correspond to any known degradation pathway. Although some of the genes could be mapped to different individual steps in the degradation pathway of PHB and related compounds[3], on the basis of their conserved domain analysis. These genes, in combination with genes identified previously by MetaCyc, indicated a possibility of the strain JL-2 be able to transform PHB. Based on this, the strain was examined for its ability to transform PHB and VAN. Preliminary HPLC analysis of the culture extracts have shown that the organism can transform both the substrates. Spectrophotometric analyses have confirmed the presence of thermostable catechol 2,3-dioxygenase and a decarboxylase and that the degradation of PHB possibly proceeds via protocatechuate and catechol. Moreover, expression of the catabolic cluster has been found to be constitutive in nature. Degradation kinetics of both PHB and VAN, as well as heterologous expression of selected catabolic genes are underway.
Conclusions: Catabolic pathways in bacteria often progress through 'vertical expansion', whereby new peripheral routes are acquired that channel newly encountered substrates into existing degradative pathways. This often occurs by recruitment of entire operon or discrete genes encoding iso-functional enzymes. The catabolic gene cluster in *T. oshimai* JL-2 is probably one such locus which is in a state of gene recruitment and evolution of catabolic pathway(s) against carboxylated aromatics like PHB or VAN. The present research will be the first attempt to reveal the genesis and evolution of pathways for catabolism of aromatic hydrocarbons in thermophiles, which are mostly known as chemolithotrophs, taking *T. oshimai* JL-2 as a model organism.

1. Hedlund BP, McDonald AI, Lam J, Dodsworth JA, Brown JR and Hungate BA (2011). Geobiology 9:471-480.
2. Karp PD, Riley M, Paley SM and Pellegrini-Toole A (2002). Nucl. Acid. Res. 30: 59-61.
3. Gerischer U, Segura A and Ornston LN (1998). J. Bacteriol. 180:1512-1524.

Biotransformation, Thermophile, Pathway evolution

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A25p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A25 会場

シアノバクテリアのビオチン生合成における新規なタイプの脱水素酵素の発見と機能解析
Functional analysis of a novel type of dehydrogenase on biotin synthesis in cyanobacteria
○榊 渓[1]、大石 恵太[1]、清水 哲[1]、小林 一幾[2]、富田 武郎[1]、田中 寛[2]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大・生物工学セ、[2]東工大・資源化学研究所)
○Kei SAKAKI[1], Keita OISHI[1], Tetsu SHIMIZU[1], Ikki KOBAYASHI[2], Takeo TOMITA[1], Kan TANAKA[2], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]Chemical Resourses Lab., TTech)

ビオチンは水溶性のビタミンであり、生体内において糖や脂肪酸代謝に関与する複数のカルボキシラーゼの補酵素として機能し、全ての生物が利用している。ビオチンの生合成では出発物質が異なる 3 種類の経路が知られているが、経路の後半部は共通の酵素群 (BioF、BioA、BioD、BioB)が反応を触媒し、ビオチンを生合成する。

しかし、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、ゲノム中に *bioF*、*bioD*、*bioB* は含まれるものの *bioA* が存在しない。我々は、機能未知タンパク質をコードする遺伝子 (*bioU*) が大腸菌 *bioA* の機能を代替すること、シアノバクテリアの *bioU* の破壊株がビオチン要求性を示すことなどを通して、*bioU* がビオチン生合成に関与することを明らかにしてきた。BioA はビオチン生合成の後半部における 7-keto-8-aminopelargonic acid (KAPA) から 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) への変換反応を触媒するアミノ基転移酵素である。我々は、BioU が BioA の代わりに KAPA から DAPA の反応を触媒していると推測し BioU の機能解析を行い、前回大会で BioU が NADH 存在下で Lys124 残基を介し KAPA と共有結合し、BioU-KAPA を形成することを発表した。今回、BioU のユニークな反応機構の解明を目指して、*in vitro* における BioU の触媒機構の解析を行った。

BioU 単体での KAPA から DAPA への変換は検出できなかったため、BioU-KAPA を調製した後、その次の反応を担う BioD を添加し、BioU-KAPA の変化と共に、dethiobiotin の生成を観察することとした。BioD は DAPA から dethiobiotin への変換反応を触媒することが知られている。その結果、BioD 及び ATP、NAD^+存在下で BioU-KAPA から dethiobiotin が生成することが分かった。BioU 単体での KAPA から DAPA への変換は検出できなかったこと、および BioD は DAPA を一旦 DAPA-carbamic acid に変換した後に、ATP を用いて dethiobiotin を生成することを考慮すると、BioU は KAPA を Lys124 に結合した後、CO_2 を窒素原子に付加し、その後 NAD^+依存的に DAPA-carbamic acid まで生成する機能を持つことが示唆される。現在、BioU の反応機構の詳細を明らかにするため、BioU の結晶構造解析を行っている。

biotin synthesis, cyanobacteria, oxidoreductase

講演番号：2A25p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A25 会場

Streptomyces sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性の向上

Thermostability enhancement of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. NT1 by the artificial protein design

○林 優花[1]、中村 誠彌[1]、酒瀬川 信一[2]、中野 祥吾[3]、伊藤 創平[3]、浅野 泰久[4]、杉森 大助[1]([1]福島大・理工、[2]旭化成ファーマ、[3]静岡県大・食品栄養科学、[4]富山県大・生工研セ)

○Yuka HAYASHI[1], Masaya NAKAMUA[1], Shin-ichi SAKASEGAWA[2], Shogo NAKANO[3], Sohei ITO[3], Yasuhisa ASANO[4], Daisuke SUGIMORI[1] ([1]Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp., [3]Shizuoka Pref. Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】 我々は、これまでに *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ（$LGOX_{NT1}$）が高い比活性を有することを見出した。本酵素を大腸菌組換え発現させた組換え酵素（$rLGOX_{NT1}$）は 55℃、30 min 活性低下が認められなかったが、実用化する場合、より高い耐熱性が要求される。そこで我々は、比活性を低下させずに本酵素の耐熱性向上を目指し、温度因子（B-factor）解析により「ゆらぎが大きい、つまり酵素分子を不安定化させる」アミノ酸を選別して部位特異的に置換した。さらに本研究では、人工タンパク質設計法により、完全コンセンサス型酵素を作製した。本発表では、B-factor に基づいた 1 アミノ酸置換による耐熱性向上と、完全コンセンサス型 LGOX（104 点置換体：Fc_LGOX）の耐熱性向上について報告する。

【方法・結果】 $LGOX_{NT1}$ の立体構造モデルを作成し、その座標データから B-factor を算出することにより、酵素分子中で揺らぎが大きいペプチド領域とアミノ酸残基を予測した。その結果、B-factor 値が高いアミノ酸が多数検出された。そこで耐熱性向上に効果的な変異導入部位をスクリーニングするために、エラープローン PCR によるランダム変異導入を行った。その結果、変異体 No. 42（MT_42）は比活性 2.42 U/mg-protein、60℃で 30 min 活性低下が認められず、既知 LGOX よりも高い比活性と耐熱性を有していた。MT_42 の変異導入部位（D397E）は B-factor 解析結果と一致し、B-factor による変異導入部位の推定の有用性が示唆された。そこで、B-factor 解析により耐熱性向上が予測された他の変異体候補 D397A、D397K、D397S 変異体を作製した。その結果、D397A が D397E と同様に 60℃まで耐熱性を示すとともに比活性も大幅に向上した（4.18 U/mg-protein）。さらに、B-factor 解析では D397 以外にも 3 カ所のアミノ酸置換が耐熱性向上に有効であると予測された。現在、これら点変異体と、各点変異を組み合わせた複数同時点変異体の耐熱性についても確認を進めている。

次に、$LGOX_{NT1}$ の相同配列 4919 配列を BLAST サーチで入手し、*in silico* 解析により $LGOX_{NT1}$ とホモログ配列間で相違が見られる領域を同定した。同定されたアミノ酸領域のうち 104 ヵ所をコンセンサス配列に置換した完全コンセンサス型 Fc_LGOX を設計し、全合成した。Fc_LGOX 遺伝子を pET24a と *E. coli* BL21（DE3）を用いて発現させた。その結果、比活性を低下させることなく、可溶性画分として菌体内（3.1 U/mg-protein）で発現させることができた。さらに、発現 Fc_LGOX は 65℃で 30 min 活性を 100%保持し、野生型の酵素と比較して耐熱性を 10℃向上させることに成功した。

L-glutamate oxidase, thermostability enhancement, consensus/artificial protein design

発表責任者：杉森 大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：2A25p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A25 会場

サルコシンオキシダーゼの環状基質反応性の改変
Alteration of cyclic substrate reactivities of sarcosine oxidase
○黒部 督恵、岡島 奨、吉田 知左、西矢 芳昭（摂南大理工）
○Masae KUROBE, Tasuku OKAZIMA, Chisa YOSHIDA, Yoshiaki NISHIYA (Setsunan Univ.)

【背景および目的】　サルコシンオキシダーゼ（Sox（EC1.5.3.1））はサルコシンの酸化的脱メチル化を触媒する酵素であり、さらにサルコシンと構造的に類似性のある L-プロリンに対しても非常に微弱な反応性を有する。われわれは、Sox の構造モデルをもとに行った基質とのドッキングシュミレーションより、L-チオプロリンの方が L-プロリンよりも親和性が高いと予想し、実験的に検証した。さらに、Sox の L-チオプロリンに対する反応性を高める変異を L-チオプロリンの結合モデルからデザインし、その変異酵素の環状基質に対する反応性評価を行ったので報告したい。
【実験方法および結果】　はじめに、ソフトウェア MOE を用いて Sox と基質の結合モデルを作成し、Sox を構成するアミノ酸のうち L-チオプロリンとの反応に関与するアミノ酸を Y254 であると推察した。インバース PCR により Y254 の変異体を種々作成し、精製後、サルコシンと L-チオプロリンに対する比活性を調べた。その結果、254 番目のアミノ酸が V よりも小さいもの（A or G）に置換されると L-チオプロリンへの反応性が向上した。Y254A および Y254G は、サルコシンよりもむしろ L-チオプロリンに対して高い反応性を示した。さらに、L-プロリン、L-ピペコリン酸などの環状基質に対する反応性向上を確認した。
【結論】　ドッキングシュミレーションにより、L-チオプロリンと反応性の高い Sox 変異体を予測し、そのことを実験的に確認した。また、Sox 変異体の環状基質に対する反応性の向上も確認した。本酵素の構造と性能の関連について、引き続き検討したい。

Sarcosine oxidase, Substrate specificity, L-Thioproline

発表責任者：西矢　芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2A25p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A25 会場

基質特異性改変型乳酸オキシダーゼの作成と新規マンデル酸測定法への応用

Alteration of substrate specificity of lactate oxidase for application to the novel mandelate assay

○西矢 芳昭、比留田 美咲（摂南大生命科学）
○Yoshiaki NISHIYA, Misaki HIRUTA (Setsunan Univ.)

【背景および目的】　有機溶剤取扱作業ではスチレンが大量に取扱われており、暴露された作業者の尿中に最終代謝産物であるマンデル酸が排出される。そのため、マンデル酸は労働安全衛生法に基づく特殊健康診断での主要な測定項目だが、高速液体クロマトグラフィーによる測定法を用いるので操作が煩雑となり時間を要する。酵素試薬を用いた分析法が開発されれば、極めて簡便に短時間の検査が可能となり大きなメリットを提供できるものと考える。

Enterococcus 属由来乳酸オキシダーゼ（LoxL）は、乳酸測定用として血液検査やバイオセンサに活用されている。われわれは、立体構造モデルを基に実用酵素である LoxL の基質特異性を改変する変異をデザインすることで、本来反応性の乏しい基質に反応する変異酵素の開発と実用化を目指している。今回、LoxL 構造モデルとマンデル酸とのドッキング・シミュレーションを行い、野生型 LoxL とマンデル酸との間に生じる立体障害を確認した。そこで、LoxL をベースとしたタンパク質工学的手法により、新規マンデル酸測定法へ応用可能なマンデル酸オキシダーゼの創成を試みた。

【方法および結果】　活性中心とその周辺をターゲットに、触媒残基に影響を与えずにマンデル酸の立体障害を軽減すると予想される三重変異をデザインした。Inverse PCR により変異体を作成し、精製後、乳酸オキシダーゼ活性およびマンデル酸オキシダーゼ活性のキネティック・パラメーターを測定した。

その結果、野生型では L-マンデル酸に対するキネティック・パラメーターが算出できないレベルの低値であった。これに対して、三重変異体の L-マンデル酸に対する Km 値は 0.17mM と見積もられ、野生型 LoxL の L-乳酸に対する Km 値（1.0mM）より低値であった。三重変異体の L-マンデル酸に対する触媒効率は、野生型 LoxL の L-乳酸に対する触媒効率の約 1/30 であった。さらに、三重変異体では L-乳酸に対するキネティック・パラメーターが算出できないレベルの低値であった。以上より、活性部位周辺のポケットを広げ、嵩高い基質との立体障害を軽減することで、L-マンデル酸の L-乳酸に対する活性比率が大幅に増加することが分かった。

【結論】　LoxL をベースに、マンデル酸に対して高い反応選択性を示すと考えられる多重変異をデザインし、マンデル酸オキシダーゼと呼べる反応性を示す変異酵素を創成することができた。今後は、さらに効果的、効率的な改変とその応用を目指したい。

lactate oxidase, substrate supecificity, mandelate

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2A25p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A25 会場

Pyrobaculum aerophilum 由来変異型マルチ銅オキシダーゼの酵素化学的性質の解析
Enzymatic properties of mutant multicopper oxidase from *Pyrobaculum aerophilum*

○平野 達成[1]、稲垣 康平[1]、里村 武範[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2] ([1]福井大院、[2]福井大ライフ、[3]香川大、[4]大阪工大)
○Tatsunari HIRANO[1], Kohei INAGAKI[1], Takenori SATOMURA[1,2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Life Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech)

［諸言］

Multicopper oxidase (MCO) は 基質分子の 1 電子酸化を介して酸素の水への還元を触媒する酵素の総称である。MCO はフェノール類を初めとする幅広い基質の酸化が可能であるために染料の脱色や工業廃水処理などへの応用に有用であり、さらに酸素の 4 電子還元を行い水を生成することからバイオ電池のカソード用素子としての利用も期待されている。我々の研究グループでは超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* から MCO (McoP) を見出し、酵素の立体構造を含む詳細な機能解析に成功している [1)]。McoP は 80℃、10 分間の熱処理でも変性せず、37℃では 30 日間失活しない高い安定性を有することが明らかになっている。しかしながら、本酵素はこれまで見出されている MCO に比べて触媒活性が低いことが応用利用への律速となっている。そこで、我々のグループでは McoP をコードする遺伝子に変異を導入して触媒活性の向上を試み、粗酵素液において野生型 McoP よりも比活性が向上した変異型 McoP を見出した。本研究ではこの変異型 McoP の高触媒化機構を解明することを目的として、McoP の詳細な酵素の性質の解明を行った。

［方法・結果］

野生型 McoP より高い MCO 活性を示した変異型 McoP では 4 つのアミノ酸が置換されていた。そこで 4 つのアミノ酸置換のうち単一のアミノ酸置換を導入した酵素を作製し、野生型酵素と各変異型酵素の触媒活性の比較を行った。その結果、1 つの単一変異型酵素において著しく高い比活性が観察された。そこで、この単一変異型酵素に対して詳細な酵素化学的性質の解析を行ったところ、この単一変異型酵素は野生型酵素と比較して基質である ABTS に対する基質親和性が 2.5 倍向上していた。また、本酵素をカーボンナノチューブと共にグラッシーカーボン電極に固定化し、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、ABTS をメディエーターとして利用しない直接電子移動反応においても反応の増大が認められた。さらに、本変異型酵素の酵素酸化還元電位を測定したところ、野生型酵素とほとんど変わらなかった。このことから、この McoP におけるアミノ酸置換は、本酵素内の電子伝達に大きく関与していることが示唆された。また、詳細な解析を行うために本変異型酵素の結晶化条件の検討も行った。その結果、本変異型酵素の結晶の作製に成功した。現在、得られた結晶を用いて単一変異型酵素の構造解析を進めている。

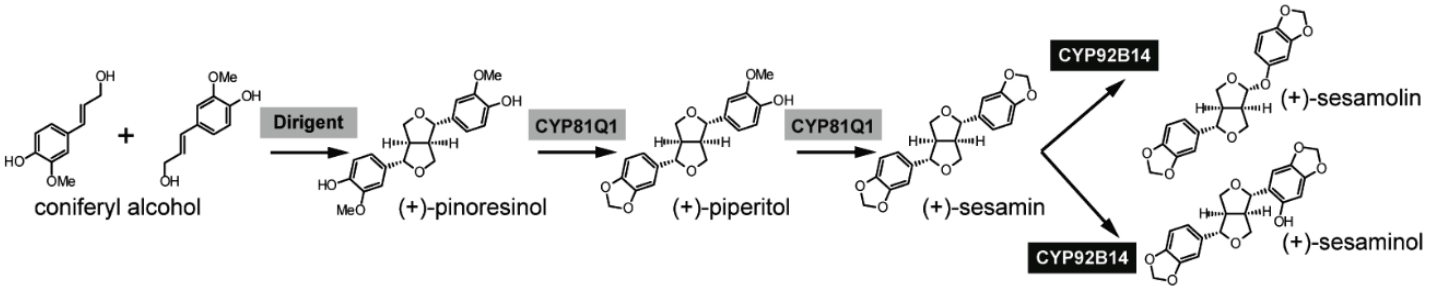
1) H.Sakuraba *et al*., *Acta Crystallographica section F67*, 753-757 (2011)

multicopper oxidase, hyperthermophile, directed evolution

講演番号：2A25p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A25 会場

ゴマリグナン新規酸化酵素の同定
Sesame CYP92B14 catalyzes unique oxidation steps of (+)-sesamin.
○村田 純[1]、小埜 栄一郎[2]、鎧塚 清吾[3]、豊永 宏美[2]、白石 慧[1]、森 祥子[1]、寺 正行[1]、東 鋭明[1]、永野 惇[4,5]、中安 大[6]、水谷 正治[6]、若杉 達也[3]、山本 将之[3]、堀川 学[1]([1]（公財）サントリー生命科学財団、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株）、[3]富山大院理工、[4]龍谷大農、[5]JST CREST、[6]神戸大農)
○Jun MURATA[1], Eiichiro ONO[2], Seigo YOROIZUKA[3], Hiromi TOYONAGA[2], Akira SHIRAISHI[1], Shoko MORI[1], Masayuki TERA[1], Toshiaki AZUMA[1], Atsushi NAGANO[4,5], Masaru NAKAYASU[6], Masaharu MIZUTANI[6], Tatsuya WAKASUGI[3], Masayuki YAMAMOTO[3], Manabu HORIKAWA[1] ([1]Suntory Fdn. Life Sci. (SUNBOR), [2]Suntory Global Innovation Center (SIC), [3]Univ. Toyama, [4]Ryukoku Univ., [5]JST CREST, [6]Kobe Univ.)

【背景・目的】リグナンは coniferyl alcohol 2 分子が Dirigent タンパク質により縮合して生成する(+)-pinoresinol を前駆体とする一群の植物二次代謝産物である。リグナンにはエストロゲン様活性や抗酸化作用、抗ガン活性を示すものが多く、健康食品素材またリード化合物として期待される。対照的に、種々の植物における(+)-pinoresinol 以降のリグナン生合成経路が不明なことも手伝って、植物自身にとってのリグナンの生理活性は未解明である。本研究では(+)-sesamin、(+)-sesamolin、(+)-sesaminol 配糖体の 3 種類の furofuran 型リグナンを種子に高蓄積するゴマ（*Sesamum indicum*）を材料に、(+)-pinoresinol から(+)-sesamin への酸化を触媒する CYP81Q1 が同定されて以降[1]長らく不明だった、(+)-sesamin から(+)-sesamolin、(+)-sesaminol を生成する酸化酵素の同定を試みた。



【方法・結果】我々はゴマの(+)-sesamolin 低蓄積系統（#4294）と対照系統との間で RAD-Seq 解析を行い、(+)-sesamolin 蓄積量と相関する染色体領域を探索した。その結果#4294 では 1 塩基挿入により CYP92B14 と名付けた新規 P450 遺伝子に C 末端 4 残基が欠失していることを見出した。興味深いことに、酵母で発現させた CYP92B14 組換えタンパク質は(+)-sesamin から(+)-sesamolin に加えて(+)-sesaminol も生成した。C 末端 4 残基を欠いた CYP92B14 組換えタンパク質は同活性を示さず、また＃4294 以外の(+)-sesamolin 低蓄積系統の CYP92B14 にも同様の 1 塩基挿入が認められたことから、CYP92B14 は(+)-sesamolin 生合成を触媒する酸化酵素であると結論付けた。一方で、#4294 でも(+)-sesaminol 配糖体は蓄積されるため、(+)-sesaminol 生合成については CYP92B14 以外の酵素の関与も示唆された。安定同位体標識した(+)-sesamin 及び分子状酸素を用いた酵素反応産物の解析から、(+)-sesamin から(+)-sesamolin 及び(+)-sesaminol への類例のない酸化反応の素過程について考察する。

[1] Ono et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 10116-10121.

sesame lignan, (+)-sesamin, P450 Monooxygenase

発表責任者：村田純（murata-j@sunbor.or.jp）

講演番号：2A25p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A25 会場

バイオ電池への応用を目指した好熱菌酵素を用いたバイオアノードの構築

Construction of bioanode for biofuel cell using thermophilic enzymes

○里村 武範[1,2]、田中 志乃[1]、坂元 博昭[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2] ([1]福井大工、[2]福井大ライフ、[3]香川大農、[4]大阪工大工)
○Takenori SATOMURA[1,2], Shino TANAKA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Life Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech.)

[目的]
バイオ電池は、酸化還元酵素を素子として基質である糖やアルコールなどが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである。バイオ電池は安全であり小型化、軽量化が可能といったメリットがある。しかしながら酵素の安定性の低さに起因する電池の耐久性や低出力の克服が課題となっている。そこで本研究では、高い安定性を有する好熱菌由来酸化還元酵素を用いることで高い耐久性を示すバイオアノードの構築を試みた。また、好熱菌由来の酸化還元酵素を複数組み合わせて多段階酸化反応を行うことで出力の課題の解決を目的として研究を行った。

[実験・結果]
アミノ酸の L-プロリンを燃料とするバイオ電池用アノードを構築するために、色素依存性 L-プロリン脱水素酵素、NAD 依存性ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素、NAD 依存性グルタミン酸脱水素酵素、色素依存性 NADH 脱水素酵素の 4 種類の好熱菌由来酸化還元酵素をカーボンナノチューブと共にナフィオン溶液に混合し、グラッシーカーボン電極上に固定化した。フェロセンカルボン酸を酵素-電極間のメディーエータとして用いてサイクリックボルタンメトリー測定を行い、4 酵素における多段階酸化反応の電気化学的評価を行った。その結果、各段階における酸化反応が進むにつれて酸化ピークの電流の増大が確認された。これらの結果より、複数の酵素を固定化した電極上で各酵素の多段階酸化反応が起っていることが確認できた。さらに、本修飾電極を用いて電池の評価を行ったところ、多段階酸化反応が進むにつれて電池出力の増加が認められた。

thermophile, oxidoreductase, biofuel cell

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：2A25p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A25 会場

酸化還元酵素担持用多孔質炭素
Porous carbon materials for redox enzyme

○辻村 清也（筑波大）
○Seiya Tsujimura (Univ. Tsukuba)

酸化還元酵素を電極触媒として用いるバイオ電池の出力および安定性を向上させるためには，酸化還元酵素の開発のみならず，酵素の本来持っている力を十分に発揮できる反応場としての多孔質電極の設計が重要となる．多孔質材料として高い導電性，安定性を有する炭素が最もふさわしく，そのマクローメソーミクロの階層構造制御が非常に重要となる．すなわち，マクロ孔は，反応物（生成物）および電解質イオンの物質輸送，および炭素材料中の酵素の分布・担持量に関わってくる．また，メソ孔構造は酵素の担持量，担持された酵素の安定性および酵素の電気化学活性に影響する．また，酵素と電極間の界面電子移動速度の向上のためにはナノレベルでの炭素表面修飾が有効である．これまで高い有効表面積を期待してナノ構造炭素を用いた電極を開発してきたが，その階層構造制御は困難であった．そこで，最近では酸化マグネシウムを鋳型とする細孔構造が制御された多孔質炭素材料を酵素担持用電極材料として開発を進めている（Fig.1）．講演では，FAD 依存性グルコース脱水素酵素およびビリルビンオキシダーゼを本多孔質炭素へ修飾するための反応系の設計指針，および得られた電極の反応性および安定性といった特性について紹介する．また，本炭素の開発により性能の向上につながった印刷型バイオ電池についても紹介する予定である．

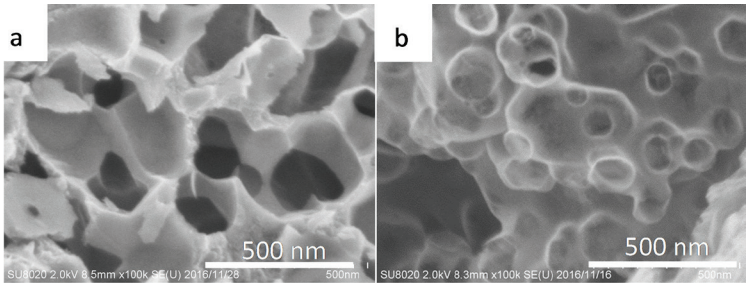


Fig.1 (a) 150 nm の酸化マグネシウムを鋳型として調製された炭素の SEM 写真．(b)40nm と 150nm の 2 種類の酸化マグネシウムを鋳型として得られた炭素の SEM 写真

参考文献

Tsujimura, S., Murata, K., Akatsuka, W., J. Am. Chem. Soc., 136, 14432-14437 (2014).

Funabashi, H., Takeuchi, S., Tsujimura, S., Sci. Rep., 7, 45147 (2017).

redox enzyme, biofuel cell, porous carbon

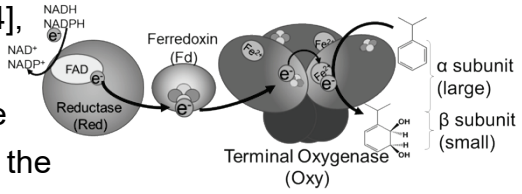
発表責任者：辻村清也（seiya@ims.tsukuba.ac.jp）

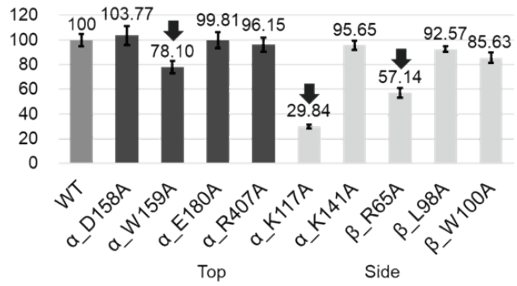
講演番号：2A25p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A25 会場

Electron transfer from ferredoxin and α3β3-type oxygenase component of Rieske non-heme iron oxygenase

○Pi-Cheng TSAI, Joydeep CHAKRABORTY, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (Tokyo Univ.)

Rieske non-heme iron oxygenases (ROs) often play a key role in the initial step of degradation of various aromatic compounds [1]. The degradation is triggered by electrons received from NAD(P)H, which are transferred directly from reductase (Red) to the terminal oxygenase (Oxy) or via a ferredoxin (Fd) [2]. Residues involved in the electron transfer between Fd and Oxy in carbazole 1,9-dioxygenase (CARDO), which has an α_3 quaternary structure, have already been determined [3]. However, those in other ROs are still unknown. Cumene 2,3-dioxygenase (CDO) [4], which is a three-component RO system belonging to class IIB in Batie's classification, catalyzes the initial step of cumene (isopropylbenzene) degradation [5]. Importantly, unlike CARDO, the Oxy of CDO has $\alpha_3\beta_3$ quaternary structure. Since both ROs have similar Rieske-type Fds as electron donor for Oxy, it would be interesting to know whether the mode of Fd-Oxy binding (electron transfer) in both these ROs are same or not. To investigate how electron transfers between Fd and Oxy in CDO, their binding site(s) need be determined. Based on the structure of CDO Oxy [5], two potential binding sites (viz. top and side-wise) were predicted using molecular docking and homology studies. The electron transfer efficiency was analyzed by measuring change in absorbance of Oxy based on its redox state. The absorbance at 457 nm were found to be different between oxidized and reduced forms of Oxy. The residues involved in the interaction between Fd and Oxy were determined by comparing the efficiency between wild-type Oxy and alanine-replaced Oxy. The results showed that the side-wise position seem to be the major binding site of Fd and that, the residue Lys_117 on α-subunit and Arg_65 on β-subunit might be involve in the electron transfer. The positively charged side chain at the side-wise position seems to be important for interacting with Fd in $\alpha_3\beta_3$-type Oxy. The electron transfer efficiency will be analyzed with multiple ananine-mutated Oxys.





[1] M. Wolfe et al., ***J. Biological Chemistry***, 276:1945-53 (2000).
[2] D.J. Ferraro et al., ***BBRC.***, 338:175-190 (2005).
[3] Y. Ashikawa et al., ***Structure***, *14*: 1779-89 (2006).
[4] H. Aoki et al., ***J. Ferment Bioeng.***, 81:187-196 (1996).
[5] X. Dong et al., ***J. Bacteriology,*** 187:2483-90 (2005).

Rieske-type oxygenase, cumene dioxygenase, electron transfer

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A25p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A25 会場

Bacillus sp. NTP-1 株における新規テルル酸還元酵素の同定とその機能解析
Identification and functional analysis of novel tellurate reductase in *Bacillus* sp. NTP-1
○葛野 侑香[1]、生田 帆河[1]、西田 亮[1]、戸部 隆太[1]、広瀬 侑[2]、Prakash Tejo[3]、三原 久明[1]([1]立命館大、[2]豊橋技科大、[3]Thapar Univ.)
○Yuka Kuzuno[1], Honoka Ikuta[1], Ryo Nishida[1], Ryuta Tobe[1], Yu Hirose[2], Tejo Prakash[3], Hisaaki Mihara[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Toyohashi Univ. of Technol., [3]Thapar Univ.)

【目的】 テルル（Te）は、カルコゲン元素に分類されるレアメタルの一つである。その特性から太陽電池や電子部品の原材料として先端産業分野で利用されており、近年、その需要が増加している。一方で、環境中に放出された場合、生体毒性の高い水溶性の Te オキシアニオン（テルル酸や亜テルル酸）として、環境汚染の一因となる。その対応策の一つとして、特殊な微生物を用いて有毒オキシアニオンを還元し、毒性の低い不溶性 Te 元素として回収する研究が注目されている。しかし、テルル酸を還元する酵素やその還元メカニズムは未だ明らかにされていない。我々はこれまでに、テルル酸還元細菌として *Bacillus* sp. NTP-1 株を単離し、全ゲノム配列を解読した。さらに、テルル酸を基質とした活性染色により、本菌が複数のテルル酸還元酵素を有することを明らかにしてきた。そこで本研究では、ゲノム情報を基に本菌のテルル酸還元酵素を特定し、その特性を酵素学的に解析することを目的とした。

【結果】 遺伝子情報から NTP-1 株のテルル酸還元酵素を推定するために、本菌の全ゲノム配列に対し、既知のカルコゲンオキシアニオン還元酵素のホモログ検索を行った。その結果、テルル酸還元酵素の候補タンパク質として Bnt_2015 を見出した。Bnt_2015 と既知のカルコゲンオキシアニオン還元酵素とのアミノ酸相同性は 20-30％ ながらも、鉄硫黄クラスターおよびモリブデンコファクター結合モチーフは保存されていた。*Bnt_2015* 遺伝子をクローニングし、テルル酸還元能が低下した大腸菌変異株を用いた相補実験を行った結果、テルル酸還元能の回復が認められ、Bnt_2015 がテルル酸還元活性を有することが示唆された。次に、Bnt_2015 の酵素学的諸性質を調べるために、His タグ融合タンパク質として精製した。精製段階において鉄硫黄クラスターの脱落が示唆されたため、再構成を施すことで 300~400 nm 付近に鉄硫黄クラスター由来のピークを有する精製タンパク質を得た。これまでの知見から、テルル酸の他に基質になる可能性のあるセレン酸、亜セレン酸、硝酸、亜硝酸、硫酸、亜硫酸をそれぞれ基質としてこれらの還元活性測定を行なった。その結果、テルル酸を基質とした場合にのみ活性が認められたことから、本酵素がこれまで報告の無い新規のテルル酸還元酵素であることが示唆された。

Tellurate reductase, Chalcogen oxyanion, Tellurium

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2A25p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A25 会場

Geobacter sulfurreducens 由来の新奇マルチヘム含有セレンタンパク質の解析
Analysis of a novel multi-heme containing selenoprotein from *Geobacter sulfurreducens*
○戸部 隆太、神農 美希、伊豆 由紀子、嶌本 奈々、三原 久明（立命大生命）
○Ryuta TOBE, Miki JINNO, Yukiko IZU, Nana SHIMAMOTO, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

グラム陰性の偏性嫌気性金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* は、ゲノム上に 111 種の c 型シトクロム（Cyt c）様タンパク質及び 10 種のセレノシステイン（Sec）含有タンパク質（セレンタンパク質）遺伝子を有する。当研究室では、本菌がサブユニット当たり 5 つのヘムと 1 つの Sec をもつ新奇 Cyt c 様セレンタンパク質 MHSEP （MultiHeme-containing SElenoProtein）を有することを見出した。しかし、MHSEP はこれまで知られているどのセレンタンパク質とも類似性がなく、その生理機能および酵素反応詳細は未だ明らかにされていない。本研究では、*mhsep* 遺伝子欠損株を用いた解析、および精製酵素としての MHSEP の酵素的諸性質の解析により、本酵素の生理機能および酵素反応の分子メカニズムの解明を試みた。

【結果・考察】

mhsep 遺伝子内部にカナマイシン耐性遺伝子を挿入した *mhsep* 欠損株を作製し、各金属の還元に及ぼす影響を調べた。その結果、鉄の還元能に変化がないのに対し、亜セレン酸および亜テルル酸の還元能が野生株に比べて大きく低下しており、MHSEP がこれらの還元に関与していることが示唆された。一方で、*mhsep* 遺伝子に Strep-tag を付加した遺伝子断片をクローニングし、*G. sulfurreducens* に導入することで MHSEP タンパク質の発現・精製系を確立した。本精製 MHSEP を用いて、基質特異性をはじめとする酵素的諸性質を解析した。これまでの知見から、基質になる可能性のあるセレン酸、亜セレン酸、テルル酸、亜テルル酸、硝酸、亜硝酸、硫酸、亜硫酸、チオ硫酸亜ヒ酸、リン酸をそれぞれ基質としてこれらの還元活性測定を行なった。その結果、亜セレン酸と亜テルル酸を基質とした場合にのみ活性が認められた。また、亜セレン酸を基質とした場合、80℃で最も高い活性を示し、60℃で 1 時間処理することで活性は半減した。さらに、本酵素の活性中心と考えられる Sec の機能を調べるため、Sec を Cys または Ala に置換した変異体を作製した。これらの変異体を用いた活性測定を行った結果、いずれも活性を示さなかったことから、本酵素は Sec を活性中心とするセレンタンパク質であることが示された。これらの結果から、本酵素はこれまで報告の無い新奇なヘム含有セレンタンパク質型の亜セレン酸還元酵素であることが示唆された。

selenoprotein, selenite reductase, Geobacter sulfurreducens

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2A25p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A25 会場

ペプチド・チオエーテル架橋形成酵素 QhpD による環状ペプチド形成機構の解明: 基質配列長および配列許容性の解析
Cyclic peptide formation by a peptide thioether crosslink-forming enzyme QhpD: Substrate peptide length and sequence allowed for the crosslink
○小酒井 一輝[1]、大関 俊範[1]、中井 忠志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1] ([1]阪大・産研、[2]広島工大・生命)
○ Kazuki Kozakai[1], Toshinori Oozeki[1], Tadashi Nakai[2], Katsuyuki Tanizawa[1], Toshihide Okajima[1] ([1]ISIR, Osaka Univ., [2]Dept. Life Sci., Hiroshima Inst. of Technol.)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に関わる *qhp* オペロンには、酵素サブユニット以外に各種の翻訳後修飾酵素遺伝子がコードされている。そのひとつ QhpD は、*S*-アデノシル-L-メチオニン（SAM）と鉄硫黄クラスターを用いて各種の難化学反応を触媒するラジカル SAM 酵素ファミリーに属し、基質ペプチド QhpC 内の特定の Cys 残基と Glu/Asp 残基の間に分子内チオエーテル架橋を形成する活性をもつ。QhpC に存在する 3 ヵ所のチオエーテル架橋は、Cys が常に Glu/Asp の 6, 8, あるいは 9 残基前に存在し、架橋で生じるキラル炭素原子がすべて *S* 型の立体配置をとる共通性をもつため、QhpD の活性部位の立体構造が基質特異性を決定していると推定される。一般的に、ペプチドは環状化により抗菌性や細胞透過性、プロテアーゼ耐性などの様々な機能が付与されることが知られており、分子内架橋により環状構造を形成する QhpD の触媒機構を詳細に解明することは、新規の機能性環状ペプチドの創出につながる。私たちはこれまでに *Paracoccus denitrificans* 由来の QhpD と QhpC を用いて *in vitro* 架橋反応系を確立し、SAM と還元剤（$Na_2S_2O_4$）の存在下で QhpC 内に架橋を形成させることに成功した（*J. Biol. Chem.*, **290**, 11144 (2015), Nakai, T. *et al.*）。QhpC は N 末端側に 28 残基のリーダー配列と成熟ペプチド鎖内に 3 ヵ所の架橋部位もつが、リーダー配列と 1 番目の架橋部位（CTTSFDPGWE：下線は架橋形成残基）のみの短縮型（sQhpC）でも QhpD の基質となり、*in vitro* で架橋反応が進行する。そこで、本研究では sQhpC をベースとした各種コンストラクトを作成し、架橋形成部位間の配列長およびその配列特異性について検討した。

まず、1 番目の架橋部位において保存性の高い 4 残基(Asp, Pro, Gly, Trp)を Ala 残基に置き換え、残基の重要性を解析した。その結果、変異体 TTSFAPGW, TTSFDPAW, TTSFDPGA は野生型と同等の被架橋形成能を持つ一方で、変異体 TTSFDAGW は被架橋形成速度が野生型の 1/10 程度に低下していた。さらに、架橋ループを 8 残基に固定したランダム変異体を用いて解析を行ったところ、ある程度の配列許容性があることを見出した。次に、架橋ループの長さに着目し、複数の変異体を基質として活性を測定した。その結果、架橋ループの長さを任意の配列や Ala のみの配列で 2, 3, 4, 5, 7, および 8 残基に短縮すると架橋が形成されるが、9 残基以上に伸長すると架橋が形成されないことが判明した。これらのことから、QhpD は新規の環状ペプチドを創出するための有用なツールとしての可能性がある。現在、さらに各種のループ配列を作成して解析を進めており、被架橋形成能の傾向について報告する予定である。

radical SAM enzyme, thioether crosslink, cyclic peptide

発表責任者：小酒井一輝（kozakai.kazuki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A25p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A25 会場

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の翻訳後修飾における修飾酵素複合体の機能解明
Functions of the enzyme complex involved in post-translational modification of quinohemoprotein amine dehydrogenase

○大関 俊範[1]、小酒井 一輝[1]、中井 忠志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1]([1]阪大　産業科学研究所、[2]広島工大　生命)
○Toshinori Oozeki[1], Kazuki Kozakai[1], Tadashi Nakai[2], Katsuyuki Tanizawa[1], Toshihide Okajima[1]
([1]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ., [2]Life Sci., Hiroshima Inst. of Tech.)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(QHNDH)は、各種のグラム陰性細菌において一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒するヘテロ三量体酵素である。これまでに 9 kDa の最小サブユニット QhpC は、２種類のユニークな翻訳後修飾構造を含有することが判明している。ひとつが Asp/Glu 残基と Cys 残基との間に形成された３つの分子内チオエーテル架橋であり、もうひとつが Trp 残基と Cys 残基から形成されたキノン補酵素システイントリプトフィルキノン(CTQ)である。架橋形成には酵素遺伝子と同一オペロンにコードされたラジカル SAM 酵素 QhpD の関与が明らかにされているが、CTQ 形成機構については未だ解明されていない。これまでに、遺伝子破壊実験の結果、オペロン内の別遺伝子 *qhpG* が CTQ 形成に必須であることが判明している。そこで、本研究は QhpG に着目し、QhpC の翻訳後修飾、特に CTQ 形成に果たす役割を解明することを目的としている。

タンパク質レベルの解析を行うため、大腸菌発現系を用いて *Pseudomonas putida* QhpG を発現・精製したところ、配列上 FAD 含有オキシゲナーゼと相同性を示すことから予想されたように、QhpG は酸化型 FAD を結合していた。一方で、QhpG の基質と想定される架橋された QhpC を得るために、*Ps. putida* QhpD と QhpC を共発現した。しかし、得られた複合体を用いて試験管内で QhpC のチオエーテル架橋形成を試みたが、不十分な架橋形成しか起こらなかった。各種の反応条件を探索したところ QhpG を QhpD/QhpC 複合体に添加することにより、完全な架橋形成が起こることが判明した。それを裏付けるように、Native-PAGE による解析の結果、架橋の有無に関わらず QhpC/QhpD/QhpG は３者複合体を形成することがわかった。さらに、QhpG による QhpC 修飾反応は、架橋形成後の３者複合体において、還元条件下で過剰量の酸素を添加すると観測された。すなわち、Asp-N プロテアーゼ消化断片の MS/MS 解析の結果、CTQ 前駆体 Trp 残基が酸素の二原子付加によって水酸化されることが示唆された。以上の結果より、QhpG は、QhpC/QhpD/QhpG３者複合体において、QhpC の Trp 残基を特異的に水酸化する活性を有することがわかった。また、この３者複合体の状態で、QhpC の 2 つの翻訳後修飾反応が進行することがわかった。現在、QhpG の保存性残基について変異体を作製し、詳細な反応メカニズムを解析しているところであり、その結果についても報告したい。

post-translational modification, quinone cofactor, cross-linked peptide

発表責任者：大関俊範（toshinori-oozeki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A26a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A26 会場

Formosa haliotis MA1 株由来 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid 還元酵素の同定

Identification of a 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid reductase from *Formosa haliotis* strain MA1

○濱地 野乃香[1]、田中 礼士[2]、モリ テツシ[3]、柴田 敏行[2]、三宅 英雄[2] ([1]三重大生資、[2]三重大院生資、[3]東農工大工)

○Nonoka HAMAJI[1], Reiji TANAKA[2], Tetsushi MORI[3], Toshiyuki SHIBATA[2], Hideo MIYAKE[2] ([1]Fac. Bioresources, Mie Univ., [2]Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ., [3]Fac. Eng. Tokyo Univ. Agri. Tech.)

【背景・目的】

アルギン酸資化性微生物は、エンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼによってアルギン酸を単糖である不飽和ウロン酸にまで分解し、そのピラノース環が開裂した 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) を生成する。その後、DEH は DEH reductase (DehR) により 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG) に還元され、解糖系とよく似た Entner-Doudroff 経路によりピルビン酸にまで代謝される。我々は、アワビの消化管から海藻を崩壊させる新種の細菌である *Formosa haliotis* MA1 株を単離した。全ゲノム解析の結果、エキソ型アルギン酸リアーゼを含む遺伝子クラスターの中に short-chain dehydrogenases/reductases と推定される遺伝子を発見した。そこで本研究では、この遺伝子が *dehR* であることを調べるために、組換え体を作製し、その酵素活性と生成物の同定を行った。

【方法・結果】

F. haliotis MA1 株のゲノム DNA を抽出し、short-chain dehydrogenases/reductases と推定される遺伝子をクローニングした。本遺伝子をプラスミドベクターpET-22b(+)に挿入することでタンパク質発現プラスミドを構築した。構築プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、形質転換体を培養した。得られた菌体を超音波破砕し、可溶性画分をニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供し、単一になるまで精製した。その結果、精製酵素を培地 1 L あたり 295 mg の収量で得ることができた。

DehR は、NADH を用いて DEH を KDG に還元する。まず初めにエンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼを用いて DEH を生成した。得られた DEH を NADH 存在下で精製酵素と反応させ、NADH が持つ 340 nm の吸収波長をモニタリングすることで活性を評価した。その結果、時間の経過とともに NADH の減少を観測した。次に、反応液を TLC に供し、生成物の検出を行ったところ、基質である DEH のスポットより低い位置に新しいスポットを検出した。LC/MS の負イオン分析を行った結果、トータルイオンクロマトグラム上で保持時間約 3.2 分に顕著なピークが検出された。得られたマススペクトルから、*m*/*z*177 に[M-H]$^-$に相当するイオンが観察された。これは KDG の理論分子量と一致する。これらの結果から、本遺伝子は、*dehR* であり、*F. haliotis* MA1 株はアルギン酸から KDG を生成することが分かった。

Formosa haliotis, 2-keto-3-deoxy-D-gluconate, reductase

発表責任者：三宅英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A26a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A26 会場

HAD スーパーファミリーに属するハロ酸脱ハロゲン化酵素のハロ酸分解活性の比較

Comparison of dehalogenase activity toward haloacids between haloacid dehalogenases in haloacid dehalogenase superfamily

○中村 卓、李 貢順、阿部 正典、佐野 裕紀、西川 穂 (長浜バイオ大学)
○Takashi NAKAMURA, Gongshun LI, Masanori ABE, Yuki SANO, Minoru NISHIKAWA (Nagahama Institute of Bio Science and Technology)

[目的]

ハロ酸デハロゲナーゼ（HAD）スーパーファミリーに属する *Pseudomonas* sp. YL 由来の L-2-ハロ酸脱ハロゲン化酵素（L -DEX YL）は、基質であるハロ酸の C-Cl 結合または C-Br 結合を容易に切断し、フルオロ酢酸（MFA）の C-F 結合をわずかに切断できる。更に、同じファミリーに属する新規の 4 種類の酵素にも MFA に対する脱フッ素化活性があることが近年報告された（Chan, W.Y. et al., Microbial Biotech. **2010**, *3*, 107-120.）。そこで、L -DEX YL と最も配列一致度の高い *Polaromonas* sp.由来の Bpro（54%）と最も配列一致度の低い *Rhodococcus* 由来の RHA（22%）に注目し、これら酵素の MFA に対する酵素活性の至適温度、至適 pH、速度論的パラメータ（K_m, k_{cat}）を算出し、どの酵素が最も MFA 分解活性を持つのか、また、フッ素の部分が塩素に置換されたモノクロロ酢酸（MCA）に対する Bpro や RHA の酵素活性はどのくらいあるのかを調査し、HAD スーパーファミリーに属するハロ酸デハロゲナーゼのハロ酢酸に対する反応の特性評価を行うことにした。

[方法]

L-DEX YL、Bpro、RHA の遺伝子をタンパク質発現用ベクターpQE30Xa に組み込み、それを *E. coli* JM109 に導入して、N 末端に His-tag を付加した目的の酵素発現系を構築した。アフィニティクロマトグラフィーで目的酵素を精製したのち、濃硫酸とクロモトピック酸を用いたグリコール酸定量法により MFA 分解活性を、チオシアン酸水銀を用いた塩化物イオン定量法により MCA の分解活性を測定した。至適温度実験は、30℃から 70℃まで、至適 pH 実験は、pH 5-10 の範囲で行った。

[結果]

MFA に対する至適温度と至適 pH を調べたところ、それぞれ、50℃と pH 7.5（L-DEX YL）、35℃と pH 8.0（Bpro）、35℃と pH 7.5（RHA）であった。一番活性の高い条件では、L-DEX YL が最も高い活性を示し、次いで Bpro、RHA となった。

次に、MCA に対する至適温度と至適 pH を調べたところ、それぞれ、50℃と pH 9.5（L-DEX YL）、55～60℃と pH 10（MCA）（Bpro）であった。RHA の活性は現在測定中である。一番活性の高い条件では、こちらの場合でも L-DEX YL が最も高い活性を示し、次いで Bpro、RHA となった。以上の結果より、現時点ではフッ素や塩素の付加したハロ酢酸に対して L-DEX YL が最も高い活性を持つことが示唆された。

haloacid dehalogenase superfamily, LDEX YL, fluoroacetate

発表責任者：中村　卓（t_nakamura@nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：2A26a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A26 会場

Ruminiclostridium josui のアラビナン分解酵素 Abn43A に存在する３つの GH43 モジュールの機能
Functions of three GH43 modules in a *Ruminiclostridium josui* arabinanolytic enzyme Abn43A
○北村 太一、粟冠 真紀子、山田 和伸、國武 絵美、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
○Taichi KITAMURA, Makiko SAKKA, Kazunobu YAMADA, Emi KUNITAKE, Tetsuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【目的】 *Ruminiclostridium josui* のアラビナン分解酵素 Abn43A は、1847 アミノ酸からなるモジュラー酵素であり、N末端側からシグナルペプチド、Laminin_G_3、GH43_22、Laminin_G_3、Big_4、GH43_26、GH43_34 およびドックリンの各モジュールで構成される。今回は、第１の Laminin_G_3 から GH43_22 の領域（RjGH43-1）、第２の Laminin_G_3 から GH43_26 の領域（RjGH43-2）および第１の Laminin_G_3 から GH43_26 の領域（RjGH43-1-2）を発現し、それらの酵素活性を比較した。また、第１の Laminin_G_3 領域（RjLG3）および GH43_22 の領域（RjGH43_22）をそれぞれ発現し、それらの酵素活性や吸着特性を比較することにより、Laminin_G_3 が糖質結合モジュール（CBM）であることを見出したので報告する。
【方法・結果・考察】 RjGH43-1 は、甜菜アラビナンに対して高い活性（361 U/μmol-protein）を示し、アラビノースを遊離したこと、3^2-α-L-アラビノフラノシル-(1,5)-α-L-アラビノトリオースを分解したことから、分岐アラビナンの側鎖を切断するα-L-アラビノフラノシダーゼであると判断した。これまで、GH43_22 の酵素活性については、エンドキシラナーゼであることを推定した例があるのみであり、本酵素はα-L-アラビノフラノシダーゼであることを示す最初の例である。RjGH43-2 は、直鎖アラビナンに高い活性（3,290 U/μmol-protein）を示し、アラビノースを遊離したことから、エキソ-1,5-α-L-アラビノフラノシダーゼであると判断した。Mg^{2+}イオンは、RjGH43-1 に対して阻害的に働いたが、RjGH43-1 に対しては２倍以上賦活化した。RjGH43-1 と RjGH43-2 を混合し甜菜アラビナンに作用させた時に遊離する還元糖量は、両酵素を単独で作用させた時の還元糖量の和の約２倍となり相乗効果が見られた。しかし、RjGH43-1-2 による還元糖の生成量は RjGH43-1 単独による還元糖量と同等であり、分子内相乗効果は見られなかった。
RjLG3 の各種多糖への吸着性を Native affinity PAGE で調べたところ、甜菜アラビナンに対して吸着性を示したが、直鎖アラビナンに対しては全く吸着しなかった。オリゴ糖などに対する吸着性を ITC により測定したところ、アラビノースおよび直鎖アラビノオリゴ糖には全く吸着しなかった。一方、pNP-アラビノフラノシド、3^2-α-L-アラビノフラノシル-(1,5)-α-L-アラビノトリオースなどに吸着性を示した。これらの結果は、Laminin_G_3 はアラビナンの側鎖（アラビノース残基）を認識し、吸着する CBM であることを示唆した。RjGH43_22 の甜菜アラビナンに対する活性は RjGH43-1 のそれの約 30%であることから、Laminin_G_3 はアラビナン側鎖の分解に重要であると思われる。

Ruminiclostridium josui, Arabinanase, Arabinofuranosidase

講演番号：2A26a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A26 会場

Ruminiclostridium josui のアラビナン分解酵素 Abn43A に存在する Laminin_G_3 モジュールの CBM としての働き

Role of a Laminin_G_3 module as CBM in a *Ruminiclostridium josui* arabinanolytic enzyme Abn43A

○粟冠 真紀子、國武 絵美、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資・生命）
○Makiko SAKKA, Emi KUNITAKE, Tetuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【目的】 *Ruminiclostridium josui* のアラビナン分解酵素 Abn43A は、1847 アミノ酸からなるモジュラー酵素であり、N 末端側からシグナルペプチド、Laminin_G_3、GH43_22、Laminin_G_3、Big_4、GH43_26、GH43_34 およびドックリンの各モジュールで構成される。Laminin_G_3 モジュールは、細胞外マトリックスの基底膜を構成するタンパク質ラミニンの G ドメインに類似のモジュールであり、コンカナバリン A 様レクチン／グルカナーゼ・スーパーファミリーに属するので、糖質結合モジュール（CBM）と予想されるが、CBM としての位置付けはされていない。今回は、N 末端側の Laminin_G_3 から GH43_22 の領域（RjGH43-1）、Laminin_G_3 領域（RjLG3）および GH43_22 の領域（RjGH43_22）をそれぞれ発現し、それらの酵素活性や吸着特性を比較することにより、Laminin_G_3 が CBM として機能することを見出したので報告する。

【方法・結果・考察】

RjGH43-1、RjLG3 および RjGH43_22 を、ベクターとして pET-28a を用いて大腸菌で発現させ、精製して用いた。RjLG3 の各種多糖への吸着性を Native affinity PAGE で調べたところ、甜菜アラビナンに対して吸着性を示したが、直鎖アラビナンに対しては全く吸着しなかったことから、分岐アラビナンのアラビノース側鎖を認識すると予想した。アラビノオリゴ糖、キシロオリゴ糖、アラビノキシロオリゴ糖などに対する吸着性を Isothermal titration calorimetry（ITC）により測定したところ、キシロース、キシロオリゴ糖、アラビノースおよび直鎖アラビノオリゴ糖に対する吸着は全く検出されなかった。一方、pNP-アラビノフラノシド（K_a = 11.8 × 10^3 M^{-1}）および 3^2-α-L-アラビノフラノシル-(1,5)-α-L-アラビノトリオース（K_a = 10.6 × 10^3 M^{-1}）に吸着性を示した。さらに、アラビノキシロオリゴ糖である 3^2-α-L-アラビノフラノシルキシロビオース（K_a = 16.6 × 10^3 M^{-1}）および $2^2,3^2$-ジ-α-L-アラビノフラノシルキシロトリオース（K_a = 20.5 × 10^3 M^{-1}）にも吸着性を示した。これらの結果は、Laminin_G_3 は分岐アラビナンの側鎖（アラビノース残基）を認識し、吸着する CBM であることを示唆した。RjGH43-1 と RjGH43_22 の甜菜アラビナンに対する活性を比較したところ、RjGH43_22 の活性は RjGH43-1 の活性の約 30%であったことから、Laminin_G_3 モジュールは分岐アラビナンの側鎖の分解に重要な働きをすることが示された。

Ruminiclostridium josui, CBM, Laminin_G_3 module

発表責任者：粟冠和郎（sakka@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A26a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A26 会場

Ruminiclostridium josui 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A の CBM6 の吸着特性および不溶性小麦アラビノキシランに対する触媒作用における重要性

Significance of a family-6 carbohydrate-binding module in *Ruminiclostridium josui* feruloyl esterase Fae1A for its activity toward insoluble wheat arabinoxylan

○間宮 愛、田中 晶善、國武 絵美、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
○Ai MAMIYA, Akiyoshi TANAKA, Emi KUNITAKE, Makiko SAKKA, Tetsuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【背景と目的】*Ruminiclostridium josui* のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A は、糖質エステラーゼファミリーCE1 の触媒モジュール、糖質結合モジュール(CBM6)およびドックリンモジュールから成るモジュラー酵素である。今回は、本酵素における CBM6 の働きを調べるため、CBM6 を発現・精製し、その吸着特性を明らかにした。また、Fae1A、Fae1A の触媒部位（CE1A）をそれぞれ発現・精製し、不溶性小麦アラビノキシランに対する活性を測定した。

【方法、結果および考察】大腸菌を用いて発現させた CBM6 の吸着性を ITC で調べたところ、CBM6 はキシロビオース（Ka=3.2×10^4 M^{-1}）や、非還元末端のキシロース残基の O-2 の位置にアラビノースが結合したキシロトリオース（A2XX）に強い吸着性を示した（Ka=1.9×10^4 M^{-1}）。様々な基質に対する ITC 結果より、CBM6 はキシロオリゴ糖の非還元末端のキシロース残基、および非還元末端のキシロース残基の O-2 のみがアラビノースで修飾されたアラビノキシランに対して結合すると予想された。CBM6 の吸着性を蛍光滴定で調べた結果、CBM6 はキシロビオース（Kd=114±1.0 μM）よりも、A2XX（Kd=60.1±0.9 μM）に対して高い親和性を示した。可溶性多糖に対する結合性を Native affinity PAGE で調べたところ、バーチウッドキシランに対する吸着性が最も低く、次いでライ麦アラビノキシラン、最も高い吸着性が確認されたのが小麦アラビノキシランであった。さらに、ライ麦アラビノキシランを *R.josui* のアラビノフラノシダーゼ Axh43B（Axh-D3）で処理した結果、処理前に比べて吸着性が高まった。これらの結果は、蛍光滴定で得られた CBM6 の A2XX に対する高い親和性を支持すると共に、ライ麦アラビノキシランと小麦アラビノキシランの構造の違いを示唆する。さらに、A2XX 存在下でのキシロビオースの蛍光滴定の結果から、この CBM6 は 1 カ所の結合部位を持つことが予想された。Fae1A および CE1A を不溶性小麦アラビノキシランに作用させ、反応開始後 1 時間、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間後の反応液を HPLC で分析した。その結果、反応開始後 6 時間までの間、Fae1A は CE1A よりもフェルラ酸を多く遊離したが、6 時間以降遊離量が逆転した。Fae1A および CE1A の 24 時間後のフェルラ酸遊離量はそれぞれ 218 μM、296 μM となった。この結果より、Fae1A が持つ CBM6 は、反応初期段階では基質に結合することにより、CE1 モジュール周辺の基質濃度を上昇させることで酵素活性を高めたが、反応中期以降は酵素の移動を妨げ、反応速度は低下したと予想された。

ferulic acid esterase, CBM6, *Ruminiclostridium josui*

講演番号：2A26a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A26 会場

糖転移作用を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索

Screening of N-acetylhexosaminidase with transglycosylation.

○天井 裕可里、倉掛 昌裕（福山大生命）
○Yukari AMAI, Masahiro KURAKAKE (Fukuyama Univ.)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。昨年は土壌より分離した *Bacillus* sp. CH11 株の N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性について報告した。しかし、自然界には未知の糖転移特性を有する酵素が存在する可能性がある。本研究では土壌より N-アセチルヘキソサミニダーゼ生産菌の分離を行い、新たな糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索を行った。

【方法】土壌からの菌の分離には 0.5%キチンオリゴ糖（東京化成㈱）、1.5%寒天の平板培地を用いた。分離菌を 0.5%キチンオリゴ糖、0.25%酵母エキスの液体培地 3ml（φ18×180mm 試験管）にて、130rpm、30℃で 3 日間培養し、培養液上清の酵素活性を測定した。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル-β-D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40℃にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1μmol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成㈱）を用い、pH7、40℃で 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体（アルコール類、糖アルコール、糖類等）への糖転移性について調べた。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成㈱）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー 蒸留水、カラム温度 60℃）を用いた。

【結果および考察】土壌からの N-アセチルヘキソサミニダーゼ生産菌の分離を行ったところ、比較的高活性の酵素生産菌 38 株が得られた。これら液体培養液上清を 2%N,N'-ジアセチルキトビオースに作用させて糖転移性について調べた。なお、糖転移性が 60%以上で反応性の低いいくつかの酵素については 80%硫安塩析で濃縮して作用させた。この結果、基質の分解率が約 60%以下で糖転移率が高くなることがわかった。また、糖転移率は分解率が低いほど高くなる傾向があり、糖転移率が 15%、47%、および 85%程度まで高くなる 3 つのグループに大別された。反応後の生成オリゴ糖の糖組成との関係を調べたところ、分解率が 35～37%にて最大になることがわかった。この時のオリゴ糖組成は約 26%であり、生成オリゴ糖は、3 糖類のトリアセチルキトトリオースの他に 4 および 5 糖類のテトラアセチルキトテトラオースおよびペンタアセチルキトペンタオースも生成した。特に高活性のカビ由来菌株酵素について硫安塩析により粗酵素を調製しその糖転移反応性について調べた。

N-acetylhexosaminidase, transglycosylation, chitin oligosaccharides

講演番号：2A26a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A26 会場

Penicillium sp. KU-1 株が生産する新規 Polyol oxidase を利用する各種希少糖の生産
Production of various rare sugars using a novel Polyol oxidase produced by *Penicillium* sp. KU-1

○黒石川 嵩幸[1]、福井 博一[1]、渡邉 彰[1]、吉原 明秀[1,2]、何森 健[1,2]、麻田 恭彦[1]（[1]香川大農、[2]国際希少糖研究教育）
○Takayuki KUROISHIKAWA[1], Hirokazu FUKUI[1], Akira WATANABE[1], Akihide YOSHIHARA[1,2], Ken IZUMORI[1,2], Yasuhiko ASADA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]International institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa Univ.)

【目的】
希少糖は自然界に存在量が少ない単糖とその誘導体であり、入手が困難であることから、これまでの研究例は少ない。しかし近年、一部の希少糖において、血糖値降下作用（D-Psicose）、癌細胞増殖抑制作用（D-Allose）など有用な生理活性があることが明らかとされた。希少糖の種類は、多岐に亘り、上記以外の希少糖においても、有用な生理活性を有する可能性を秘めていることから、研究の推進が望まれている。従来、酵素を利用する各種希少糖の生産は、主として異性化酵素が利用されてきた。しかし、異性化酵素は、基質と生成物の平衡反応（可逆反応）を触媒するため、生産における収率の低さや基質と生成物の分離が必要となることが問題となってきた。そのため、より効率的な生産方法の確立が求められている。そこで、本研究では、不可逆反応を触媒する *Penicillium* sp. KU-1 株由来 Polyol oxidase を利用する新規の希少糖生産方法の確立を目的とした。
【方法】
本菌株の培養は小麦フスマ固体培地を用いて行った（15°C、10 日間）。本酵素の粗酵素溶液は、本菌が生育した小麦フスマ固体培地から調製した。粗酵素溶液から、硫安分画および各種液体クロマトグラフィーにより本酵素の精製を行い、得られた部分精製酵素を反応生成物の分析および希少糖生産における反応条件の検討に用いた。また、本酵素をイオン交換樹脂に結合させて作製した固定化酵素を用いる希少糖生産についても検討した。
【結果および考察】
本酵素は基質特異性が非常に広く、Erythritol（100%）、D-Arabitol（86%）、Ribitol（71%）、D-Sorbitol（68%）、D-Mannitol（62%）、Xylitol（24%）、Allitol（22%）、D-Talitol（19%）、Glycerol（10%）、Galactitol（4%）の順に高い活性を示した。また、本酵素は各種ポリオールを基質として、L-Erythrose（基質：Erythritol）をはじめ、L-Gulose（基質：D-Sorbitol）、L-Allose（基質：Allitol）といった複数の希少糖の生成反応を触媒することが示唆された。また、本酵素の部分精製標品を用いる希少糖（L-Gulose）の生成反応においては、D-Sorbitol から 90%以上の変換率で L-Gulose が生成されることが明らかとなった。また、固定化酵素を利用する反応においても 90%以上の変換率で L-Gulose が生成された。さらに、固定化酵素は、繰り返し利用することも可能であることを確認した。以上のことから、本酵素が複数種の希少糖生産に有用な酵素であることが強く示唆された。

rare sugar, polyol oxidase, *Penicillium*

発表責任者：黒石川嵩幸（kuroishikawa1217@gmail.com）

講演番号：2A26a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A26 会場

Stenotrophomonas maltophilia NYT501 由来 β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素化学的性質

Enzymological properties of β-*N*-acetylhexosaminidase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYT501

○宮 弘昂[1]、平野 貴子[1,2]、平川 礼人[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化）

○Hirotaka MIYA[1], Takako HIRANO[1,2], Ayato HIRAKAWA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

[目的] キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）が β-1,4 結合で直鎖上に結合した高分子化合物であり、地球上ではセルロースに次いで 2 番目に多く生産される多糖である。キチンは主にカニやエビなどの甲殻類の殻に多く含まれており、近年その利用価値が見出されてきた。キチンの分解により得られる単糖やオリゴ糖にはさまざまな生理作用があることが報告されている。キチンオリゴ糖の性質をより詳しく調べるためには、効率の良いキチンオリゴ糖の生産・精製方法の開発が必要である。

キチンオリゴ糖を生産する方法として、現在は、強酸を用いた化学分解法が用いられている。しかし、本法では特定鎖長のキチンオリゴ糖を特異的に生産することが難しいため、各鎖長のオリゴ糖の機能性についてはあまり調べられていない。そこで、生成物特異性の高い酵素法によってキチン由来オリゴ糖の生産を行うことにした。当研究室では既に、酵素法を用いてキチンから *N,N'*-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］を大量に効率良く生産することが可能である[1)]。そこで次に、$(GlcNAc)_2$ を基質とした糖転移反応による GlcNAc の 3 糖や 4 糖の生産を目指して研究を進めてきた。前大会で報告した *Stenotrophomonas maltophilia* NYT501 は、糖転移活性の高い β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ（NAG）を生産すると考えられ、これまでに本菌の全細胞触媒を用いて、$(GlcNAc)_2$ から *N,N',N''*-triacetylchitotriose ［$(GlcNAc)_3$］の生産に成功している[2)]。そこで、この NAG の酵素化学的性質を調べ、さらに効率良く糖転移反応を進め、中程度の鎖長の GlcNAc オリゴマーを生産したいと考えた。

[方法と結果] NYT501 株由来 NAG の酵素化学的性質を解明するため、組換え体酵素を生産した。NYT501 株からゲノム DNA を抽出し、PCR で NAG 遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子断片を pET22b(+) ベクターにライゲーションし、大腸菌 HMS174 (DE3) に形質転換した。なお、このプラスミドは C 末端側に His タグが付加されるように構築した。この組換え大腸菌を培養し、IPTG 添加による酵素生産誘導を行った。その後、菌体を破砕して粗酵素液を回収し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE 的に単一なタンパク質を得た。本発表では、この NAG の基本的な酵素化学的性質を報告する。

1）Minamoto, T., Nishio, T. *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **175**, 3788-3799 , 2015

2）Uehara, A., Nishio, T. *et al., Appl. Biochem. Biotechnol.*, Published online : 24 August 2017

Stenotrophomonas maltophilia, β-*N*-acetylhexosaminidase, chitin oligosaccharide

発表責任者：平野　貴子（hirano.takako@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A26a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A26 会場

海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素：異種発現と諸性質検討
Expression and characterization of fucoidanase from *Luteolibacter algae* H18
○荒井 良仁[1]、長尾 達彦[2,3]、小松 史佳[2]、八木 寿梓[4]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2] ([1]鳥取大院持社創科、[2]鳥取大院工、[3]日本ジッコウ(株)、[4]鳥取大 GSC)
○Yosihito ARAI[1], Tatsuhiko NAGAO[2,3], Humika KOMATSU[2], Hisashi YAGI[4], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]Tottori Univ. Grad. Sch. Sustain. Sci., [2]Tottori Univ. Grad. Sch. Eng., [3]Nippon Jikkou., [4]Tottori Univ. GSC.)

【目的】
フコイダンとは昆布やワカメなどの褐藻のヌメリ成分に含まれる硫酸化多糖の一種であり、主に L-フコースが α1-2、α1-4 結合で数十から数十万個も繋がった化合物で、平均分子量は約 200,000 とされている。フコースのほかに中性糖としてガラクトース、キシロースや、それ以外にグルクロン酸などを含んでいる。フコイダンには様々な生理活性があり、アレルギーやガンの治療薬として期待されているインターロイキンあるいはインターフェロンの産出を高める効果や、ヘパリンのような血液凝固を妨げる作用、血液中のリパーゼの活性を高める作用などがあり医薬品としての期待がもたれている。
当研究室では、オキナワモズク由来フコイダンの生理活性とその構造との関連の解明を目的とした研究を行っている。活性と構造の関連解明には、フコイダン低分子化酵素の利用が有効であると考えられるが、今まで学術的に報告された文献は少ない。本研究では、オキナワモズク由来フコイダンの低分子化酵素を *Luteolibacter algae* H18 株から精製し、その遺伝子をクローニングして、異種発現し、酵素化学的特性を検討することを目的とする。

【方法・結果】
フコイダンを単一炭素源とする完全合成培地で H18 株を培養して得られた無細胞抽出液から酵素精製を行い、N 末端アミノ酸配列を決定した後、H18 株のドラフトゲノム DNA 情報を基に、このアミノ酸配列をコードする一つの ORF を見出した。すでに明らかにしているドラフト DNA 情報から推定される本酵素のサブユニットの分子量は 111.7 kDa であり、これは SDS-PAGE での結果と一致した。本酵素のアミノ酸配列に対して BLAST 検索を行ったところ、相同性が高いタンパク質の多くは機能未知であり、アノテーションされた機能既知のタンパク質の中で最も相同性が高いのは *Sphingomonas sanguinis* 由来の glycosyl hydrolase（相同性 26%）であった。本酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ、得られた無細胞抽出液を用いて酵素反応を行ったところ、脱アセチル化フコイダンの低分子化が起こることが確認でき、H18 株由来のフコイダン低分子化酵素遺伝子のクローニングができたと考えられた。本酵素の酵素化学的性質を、還元糖の濃度を測定する Somogyi-Nelson 法を用いて検討したところ、至適温度は 45℃、至適 pH は 7.3 であることがわかった。

fucoidan, fucoidanase, glycoside hydrolase

講演番号：2A26a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A26 会場

フコイダン分解細菌 *Luteolibacter algae* H18 のフコシダーゼについて
Fucosidase from fucoidan degrading bacterium, *Luteolibacter algae* H18
○長尾 達彦[1,2]、山岡 美花[1]、荒井 良仁[1]、八木 寿梓[3]、鈴木 宏和[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]日本ジッコウ株式会社、[3]鳥取大・工・GSC)
○Tatsuhiko NAGAO[1,2], Mika YAMAOKA[1], Yoshihito ARAI[1], Hisashi YAGI[3], Hirokazu SUZUKI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]NipponJikkou Co.,Ltd., [3]Tottori Univ. GSC)

【目的】
フコイダンは、褐藻類が有する粘質多糖の一種であり、構成糖として硫酸化フコースを持つことを特徴とするヘテロ硫酸化多糖である。フコイダンの分子量は数十万であるが、海藻の種類によって構成糖の種類や結合様式、分子量が大きく異なり、ガラクトースやキシロース、ウロン酸を含む場合もある。フコイダンには抗凝血作用や抗ウイルス作用、免疫賦活作用、抗腫瘍作用など多くの生理活性が報告されており、医療や健康食品への応用が期待されている。しかしながら、フコイダンが関与するこれら生理活性がフコイダン分子中のどの構造に起因するかについては不明な点が多いのが現状である。当研究室では、オキナワモズク（*Cladosiphon okamuranus*）由来フコイダンの生理活性機構の解明を目指して、酵素的な低分子化に取り組んでいる。すでに単離しているオキナワモズクフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に有しており、H18 株の酵素によってフコイダンが中間体を経て低分子化され、最終的にフコースにまでに分解資化されると想定される。そこで、本研究では H18 株のドラフトゲノム DNA 配列からエキソ型酵素であるフコシダーゼをコードすると推定される遺伝子を大腸菌で発現させ、その特性を評価した。

【方法・結果】
フコシダーゼとアノテーションされている ORF は合計 5 種類（*fc1*～*fc5*）見出され、それぞれ発現ベクター pCold I あるいは pCold TF へクローニングし、大腸菌で発現させた。これらの推定分子量は 53～65 kDa、それぞれの間の塩基配列の相同性は 33～50%であり、5 種類のうちの一つ *fc5* は、H18 株の脱アセチル化フコイダン低分子化酵素遺伝子の近傍に位置していた。得られた無細胞抽出液の遠心上清に、SDS-PAGE 上で目的タンパク質の分子量付近にタンパク質の生産が見られた。酵素反応を、4-nitrophenyl-α-L-fucopyranoside を基質として行ったところ、5 種類中、Fc5 を含む 3 種類の酵素がフコシダーゼ活性を示した。さらに、Ni-Sepharaose による酵素精製後、4-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside をはじめとする他の糖質の人工基質に対する活性を評価したが、いずれも 4-nitrophenyl-α-L-fucopyranoside だけに対する活性しか認められなかった。これら酵素が高分子量のフコイダン分解に関与しているかどうかについても報告する。

Fucoidan, fucose, fucosidase

講演番号：2A26a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A26 会場

α-galactosidase に想定される新奇な基質認識機構

Substrate recognition mechanism of α-galactosidase

○菊池 麻子、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫（北大院農）
○Asako KIKUCHI, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】Glycoside hydrolase family 97 (GH97) では，これまでに保持型酵素として α-galactosidase (Galase と略)，bifunctional 特異性を示す β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase (Ara/Galase と略) が報告されている．我々は，両酵素の差異が α-galactoside の 6 位水酸基に対する認識機構であることを明らかにした．すなわち，Galase では Glu351 が 6 位水酸基と水素結合を形成し α-galactoside を安定化するが，Ara/Galase では相当する部位に Asn338 が位置し，本 Asn 残基が bifunctional な基質特異性に関与することを解明した．本研究では *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 が有する *BT_3664* 遺伝子産物，BT3664 に注目した．GH97 に分類される機能未知タンパク質 BT3664 は，Ara/Galase と同じサブファミリーに属しており，Galase の Glu351 または Ara/Galase の Asn338 に対応するアミノ酸残基として Ala334 を有している. BT3664 の基質特異性および基質認識機構の解明を目的とし, 研究を行った．
【方法と結果】組換え BT3664 を Ni-アフィニティーならびにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した. 本タンパク質について, 種々の *p*-nitrophenyl (*p*NP) 合成基質を用い, 基質特異性を評価した．BT3664 の *p*NP α-D-galactopyranoside (*p*NP Gal) または *p*NP β-L-arabinopyranoside (*p*NP Ara) に対する加水分解速度パラメータ (k_{cat}/K_m) は，それぞれ 2.0 $s^{-1}mM^{-1}$，0.076 $s^{-1}mM^{-1}$ であった．bifunctional な基質特異性を示す Ara/Galase では，*p*NP Gal または *p*NP Ara に対する k_{cat}/K_m は，*p*NP Ara の方が *p*NP Gal よりも 2 倍程度大きかったが，BT3664 では *p*NP Gal の方が *p*NP Ara よりも 20 倍以上大きくなった．また，D-fucose (6-deoxy-D-galactose) が *p*NP Gal 分解活性の阻害剤として働くことが分かった．Ala334 の基質認識への関与を調べるため Ala334 を Asn に置換した変異酵素 A334N を作製し，その基質特異性を解析した．A334N の *p*NP Gal に対する k_{cat}/K_m は 0.24 $s^{-1}mM^{-1}$ であり，野生型よりも 8 倍程度小さくなったが, *p*NP Ara に対する k_{cat}/K_m は 0.062 $s^{-1}mM^{-1}$ であり, 野生型と比べてほとんど変化がなかった．A334N が Ara/Galase 様の bifunctional な基質特異性を示さなかったことから，BT3664 は Ara/Galase とは異なる機構で基質を認識すると考えられた. BT3664 と D-fucose の複合体構造を分解能 1.6 Å で決定した. BT3664 の活性ポケットは Galase および Ara/Galase と類似しており, Ala334 は Galase の Glu351, Ara/Galase の Asn338 に相当する部位に位置していた．Galase では Glu351 の側鎖が α-galactoside の C6 水酸基を水素結合により認識しているのに対し，BT3664 では Ala334 や Pro374 が C6 と相互作用することが予想された．すなわち，GH97 に新たな基質認識機構が存在することが示唆された．

D-fucose, substrate recognition, α-galactosidase

発表責任者：菊池　麻子（akikuchi@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A26a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A26 会場

ヒト・ドリコールピロリン酸ホスファターゼ hDPP の物理的相互作用の解析

Analyses on the physical interactions of the human dolichol pyrophosphate phosphatase, hDPP

○高橋 哲夫、傅能 康成、山本 達也、北田 翔太（東海大工）
○Tetsuo Takahashi, Yasunari Dennou, Tatsuya Yamamoto, Shota Kitada (Tokai Univ.)

【目的】ヒト・ドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP)は、粗面小胞体(rER)膜に局在し、内腔側でオリゴ糖転移酵素複合体により蛋白質の N-グリコシル化が行われる際、ドリコール中間体(DLO; $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol)から糖鎖部分が切断された後に生じるドリコールピロリン酸(Dol-PP)を特異的に脱リン酸化する酵素である。本酵素の 2 次構造として、7 つのループ領域(loop region 1～7; LR1～7)と 6 つの疎水性領域(hydrophobic region 1～6; HR1～6)が想定されたが、これまでに我々は、酵母 split-ubiquitin システムを利用して hDPP1 の膜配向性を決定し、本酵素が HR1, 3, 4, 5 を介して rER 膜を少なくとも 4 回貫通し、N 末端及び C-末端を細胞質側に配向していることを明らかにした。さらに我々は、同システムを利用して蛋白質間の物理的相互作用の解析を行い、hDPP が hDPP 自身、ヒトドリコールキナーゼ(hDOLK)、ヒト GlcNAc-1-P 転移酵素(hGPT)、ヒトドリコールリン酸グルコース合成酵素(hDPGS)、ヒトドリコールリン酸マンノース合成酵素(hDPMS)の 2 つの膜貫通サブユニット(hDPM2 及び hDPM3)及びヒト MPDU1 蛋白質(hMPDU1)と物理的に相互作用することを明らかにしている。そこで本研究では、引き続き酵母 split-ubiquitin システムを利用して、これらの酵素との相互作用に重要な役割を果たす本酵素中の領域について、より詳細に調査することにした。

【方法及び結果】hDPP の N 末端から LR1 及び HR1 までを欠失したベイトコンストラクト(それぞれ pBT-N-hDPP *ΔN31* 及び pBT-N-hDPP *ΔN52*)を新たに作製した。同様に、hDPP の C 末端から HR6、HR4、HR3、HR2 及び LR12 までを欠失したベイトコンストラクト(それぞれ pBT-N-hDPP/LR6、BT-N-hDPP/LR4、BT-N-hDPP/LR3、BT-N-hDPP/LR2 及び pBT-N-hDPP/HR1)を新たに作製した。これらを上記 5 種類の酵素プレイコンストラクト(pPR-N-x または pPR-C-x)と組み合わせて酵母 NMY51 株を形質転換した。得られた欠失 hDPP ベイト/プレイ共発現株についてレポーター検出培地上での増殖性を観察し、全長 hDPP ベイト発現時に見られた各酵素との相互作用への影響の有無を検討した。その結果、hDPP の N 末端から 31 アミノ酸までの LR1 を欠失してもすべての相互作用が維持された。しかし、hDPP の N 末端から HR1 までを欠失すると hDPP 自身、hGPT 及び hMPDU1 との相互作用の消失が観察された。一方、C-末端側から HR6 までを欠失すると hDPM2 との相互作用が消失し、HR3 までを欠失すると hDOLK 及び hDPGS との相互作用が完全に廃止され、hDPM3 との相互作用は殆ど廃止されることが判明した。これらの結果から、hDPP には触媒ドメイン以外に、rER 膜で他酵素との物理的に相互作用するのに必須な 3 つの領域が存在することが強く示唆された。

dolichol pyrophosphate phosphatase, physical interaction, split-ubiquitin system

講演番号：2A26a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A26 会場

GH130_2 マンノシドホスホリラーゼの単糖受容体特異性とアミノ酸残基の関係による分類
Classification of GH130_2 mannoside phosphorylase based on relationship between amino acid residues and monosaccharide acceptor specificity
○播磨 晃帆、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Akiho HARIMA, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】糖質加水分解酵素ファミリー130 (GH130) は，5-ブレード β-プロペラ構造を持つ β-マンノシドホスホリラーゼを含む酵素群であり，GH130_1，GH130_2，および GH130_NC の 3 群に分類される．GH130_2 は 4 つの活性既知酵素が存在し，それらの活性は以下の 3 種類に分類される．A, β-1,4-マンノシルキトビオースホスホリラーゼ (Man-NAG$_2$-P) 活性; B, A と C の中間的な基質特異性; C, β-1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ (MOP) 活性．A には *Bacteroides* sp. 由来 Uhgb_MP が含まれ，ブレード 1β4 (B1-β4) 上の Met67 と，ブレード 3 と 4 を繋ぐループ 3 上の Phe203 が，サブサイト+1 の GlcNAc 特異性に重要であることが明らかになっている．B には *Ruminococcus albus* 由来 RaMP2 が，C には *Thermotoga maritima* 由来 TmMOP が含まれる．RaMP2 は三糖以上のマンノオリゴ糖に特異的な MOP であるが, 二糖では Man$_2$ よりも Manβ1-4Glc および Manβ1-4GlcNAc に高い加リン酸分解活性を示す点で TmMOP と異なる．本研究では RaMP2 と TmMOP の逆反応の単糖受容体特異性に関わるアミノ酸残基の解明と，それに基づく GH130_2 酵素の分類を目的とした．
【結果と考察】Uhgb_MP は，Met67 と Phe203 の周辺にブレード 5β2 (B5-β2) 上の Leu234 を持つ．この Leu (または Ile) は B1-β4 上に Met を持つタンパク質の多くに保存されており，RaMP2 は Leu242 を持つ．一方 TmMOP は B1-β4 上に Pro69，B5-β2 上に Thr234 を持ち，ループ 3 上に Trp207 を持つ．そこで RaMP2 の L242T 変異酵素と TmMOP の W207A 変異酵素を解析した. 受容体基質を Man, GlcNAc, Glc および Man$_2$ とし, 10 mM α-Man1*P* 存在下での β-マンノシド合成反応速度 (リン酸遊離速度) の見かけの速度定数を測定した．基質特異性は $k_{cat(app)}/K_{m(app)}$値に基づき評価した．RaMP2_L242T の $k_{cat(app)}/K_{m(app)}$値はいずれも低下したが，Man，Glc および Man$_2$ よりも GlcNAc に対する $k_{cat(app)}/K_{m(app)}$値が顕著に低下した．したがって Leu242 がサブサイト+1 において GlcNAc への特異性に関わると考えられた．TmMOP_W207A では，Glc と GlcNAc に対しては大きな変化は見られなかったが，Man と Man$_2$ に対しての $k_{cat(app)}/K_{m(app)}$値は大きく減少した．したがって Trp207 がサブサイト+1 において Man への基質特異性に関わると考えられた．以上より B1-β4，ループ 3 および B5-β2 の該当アミノ酸残基に基づき，GH130_2 は以下の 3 群に分類可能であると推定される．A, Man-NAG$_2$-P 型 (Uhgb_MP の Met67/Phe203/Leu234 相当残基を持つ); B, A と C の中間的な基質特異性型 (ループ 3 上の Phe を持たず，RaMP2 の Met75/Leu242 相当残基を持つ); C, MOP 型 (TmMOP の Pro69/Trp207/Thr234 相当残基を持つ).

Glycoside hydrolase 130, Mannoside phosphorylase

講演番号：2A26a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A26 会場

Melioribacter roseus 由来セロビオース 2-エピメラーゼは単糖基質にも有意な活性を示す
Cellobiose 2-epimerase from *Melioribacter roseus* has apparent activity to monosaccharide substrates.

○佐藤 鈴佳[1]、佐分利 亘[1]、飯塚 貴久[2]、森 春英[1]（[1]北大院農、[2]日本食品化工（株））
○Suzuka SATO[1], Wataru SABURI[1], Takahisa IIZUKA[2], Haruhide MORI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Nihon shokuhin kako Co.,LTD)

【背景・目的】
セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は，β-(1→4)-結合からなる二糖の還元末端の Glc 残基と Man 残基間をエピメリ化する．CE 生産菌の多くは CE 遺伝子周辺にエンド-β-1,4-マンナナーゼ，β-マンノシダーゼ，4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼ等のマンナン代謝酵素をコードする遺伝子を有する．*Melioribacter roseus* 由来 CE 様タンパク質 MROS_0506 は上記のようなβ-マンナン代謝酵素遺伝子近傍にコードされる．しかし，既知 CE とのアミノ酸配列同一性は 20%程度と低い．配列比較から MROS_0506 では CE の触媒ドメイン $(\alpha/\alpha)_6$ バレルにおいて二糖基質の非還元末端糖残基の結合部位周辺に位置する 7 番目と 8 番目のαヘリックスを繋ぐα7→α8 ループが他の CE より長いことが推定され，その機能に興味が持たれた．本研究ではこの MROS_0506 の諸性質を解析した．
【結果・考察】
MROS_0506 の C 末端に His タグを付加した組換え酵素を *E. coli* BL 21 (DE3)で発現させ，Ni-アフィニティークロマトグラフィーで精製した．培養液 1 L から精製標品 70 mg が得られた．MROS_0506 は，既知の CE と同様にβ-(1→4)-マンノビオース (Man_2)，セロビオース，ラクトース等のβ-(1→4)結合を有する二糖にエピメリ化活性を示しただけでなく，D-Glc と D-Man 間および D-Gal と D-Tal 間のエピメリ化活性を示した．D-Glc および D-Man の 4 位エピマーである D-Gal および D-Tal へのエピメリ化活性は初めて確認された．MROS_0506 は pH 2.0－12 (4°C，24 時間) および 50°C 以下 (pH 8.0, 30 分間) で 80%以上の活性を保持した．pH 8.1 および 56°C で最大活性を示した．37°C において Man_2 に対し，k_{cat} 648 s^{-1}，K_m 5.61 mM であり，Man に対しては k_{cat} 4.07 s^{-1}，K_m 49.7 mM であった．*Ruminococcus albus* 由来 CE (RaCE) (37°C)，*Cellvibrio vulgaris* 由来 CE (CvCE) (37°C) および *Rhodothermus marinus* 由来 CE (RmCE) (60°C)の速度パラメーターと比較して，同一反応温度における MROS_0506 の Man_2 に対する k_{cat} は 3.2－6.4 倍高く，k_{cat}/K_m も 4.6－5.0 倍高かった．また，CvCE および RmCE では Man に対する k_{cat}/K_m は Man_2 に対する値のそれぞれ 0.002%および 0.03%であるが，MROS_0506 では 0.07%であった．Man_2 に対する活性と比較すると低いが，MROS_0506 の Man に対する k_{cat}/K_m は CvCE および RmCE の 180 倍および 15 倍であり，これら CE より高い活性を示した．

cellobiose 2-epimerase, epimerization, Melioribacter

講演番号：2A26a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A26 会場

Thermoanaerobacter siderophilus 由来 TsGH15A の各種基質に対する糖転移反応の解析

Analysis of Transglycosylation Activity of TsGH15A from *Thermoanaerobacter siderophilus*

○竹田 夏美、三島 英莉、佐分利 亘、貞廣 樹里、木村 淳夫、森 春英（北大院農）
○ Natsumi TAKEDA, Eri MISHIMA, Wataru SABURI, Juri SADAHIRO, Atsuo KIMURA, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】*Thermoanaerobacter siderophilus* 由来 TsGH15A は，N 末端側から glycoside hydrolase family（GH）66 ドメイン，carbohydrate binding module 35 ドメイン，および GH15 ドメインからなるマルチドメインタンパク質である．GH66 ドメインを欠失させた TsGH15AΔN は，グルコアミラーゼやグルコデキストラナーゼなど GH15 で主要なアノマー反転型加水分解酵素とは異なり，マルトオリゴ糖には主として α-(1→4)-グルコシル転移，イソマルトオリゴ糖には主として α-(1→6)-グルコシル転移を触媒する．GH15 のデキストラン生成酵素 Dextran Dextrinase は同様の反応を触媒するが，TsGH15AΔN は高分子量のデキストランの生成を行わない．本研究では，この変異酵素を用い，マルトオリゴ糖，イソマルトオリゴ糖，および可溶性デンプンを基質とした初期反応と，グルコシル基を持つ様々な糖に対する転移反応を解析した．

【結果と考察】TsGH15AΔN のマルトオリゴ糖（G2～G5），イソマルトオリゴ糖（IG2～IG4）および可溶性デンプンに対する初期反応生成物を HPAEC-PAD により解析した．G2 に対する反応では，α-(1→6)-転移生成物のパノースと α-(1→4)-転移生成物の G3 の生成が見られ，生成速度はそれぞれ 10.8 および 4.39 μmol/min/mg であった．G3～G6 に対する反応では α-(1→4)-転移生成物，イソマルトオリゴ糖に対する反応では α-(1→6)-転移生成物の生成速度に基づきグルコシル転移速度を求めた．G3，G4 および G5 に対する速度はそれぞれ 94.5，54.1 および 81.7 μmol/min/mg であり，G2 に対する速度（パノースと G3 の生成速度の合計値 15.2 μmol/min/mg）の 3.6～6.2 倍と高かった．イソマルトオリゴ糖に対する反応速度はいずれもマルトオリゴ糖に対する速度よりも低く，IG2，IG3 および IG4 に対する速度はそれぞれ 3.72，11.1 および 13.6 μmol/min/mg であった．本酵素は，イソマルトオリゴ糖に対する反応でも三糖以上の基質に高い速度を示した．可溶性デンプンを基質とした反応では，加水分解によるグルコースの生成が確認され，反応の進行とともに，グルコースに対する α-(1→6)-転移生成物イソマルトオリゴ糖の蓄積が見られた．加水分解速度は 1.02 μmol/min/mg であった．生成したグルコースのアノマー型を現在解析中である．次に，各種グルコ二糖，スクロース，メチル α-グルコシド，*p*NP α-グルコシド，および *p*NP β-グルコシドを糖受容体，可溶性デンプンを糖供与体とした反応生成物を TLC により解析した．これら全ての受容体に対する転移生成物が確認された．ニゲロース（Glc α 1-3Glc）を基質とした場合，重合度ごとに 2 種類の生成物が得られ，そのうち一方がグルコアミラーゼにより分解され，α-(1→4)-グルコシル転移生成物と考えられた．

glycoside hydrolase family, *Thermoanaerobacter siderophilus*, transglycosylation

講演番号：2A26p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A26 会場

酵素活性測定に有用なβ-1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立

The establishment of the colorimetric determination for β-1.2-glucooligosaccharides

○小林 海渡[1]、中島 将博[1]、中井 博之[2]、田口 速男[1]([1]東理大理工、[2]新潟大農)
○Kaito KOBAYASHI[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Hiroyuki NAKAI[2], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Niigata Univ.)

（目的、背景）β-1,2-グルカンは、グルコースがβ-1,2-グリコシド結合で重合している糖鎖であり、自然界では主に環状糖として存在することが知られている。近年、直鎖状β-1,2-グルカンの大量合成法が確立され、さらに細菌由来β-1,2-グルカナーゼが単離同定された。多糖分解酵素の活性測定には分解産物 の還元力の増加を比色法により測定する方法が一般的であるが、Somogyi-Nelson 法ではβ-1,2-グルカン、β-1,2-グルコオリゴ糖（Sop_ns、n は重合度）が全く発色しないことが報告されている（*Journal of General Microbioogy*, 1982, **128**, 1873-1879, Hisamatu M. *et. al.*）。このβ-1,2-グルカナーゼでは、PAHBAH（4-hydroxybenzoic acid hydrazide）法によってβ-1,2-グルカン分解活性を測定しているが、定量法としての有効性の評価は行われていない。近年、β-1,2-グルカン関連酵素の多様性が明らかになりつつあるため、β-1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法を確立することは、この酵素群の解析の上で重要であるといえる。そこで本研究では、β-1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法を検討し、最適化した。

（方法、結果）様々な糖の還元末端を認識する比色定量法を Sop_2 を用いて調べた結果、Somogyi-Nelson 法、DNS 法ではほとんど発色しなかった。一方、PAHBAH 法や MBTH(3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン)法などヒドラジンをベースとする発色試薬を用いた場合では発色したため、発色が生じるのはヒドラジンの反応性が他の比色定量法の試薬に比べて高いことによると推測される。しかし、ソホロースによる発色はグルコースと比べて低かった。さらに、PAHBAH 法では 3 糖以上の Sop_ns ではソホロースよりも顕著に発色が少なかったため、β-1,2-グルコオリゴ糖混合物が生成するβ-1,2-グルカナーゼの定量には適していないと言える。そこで、 MBTH と糖の還元末端を反応させアジンを生成し、アジンと酸化型 MBTH を反応させて生じる青色色素を定量する方法（MBTH アジン法、Gordon E. A. and Diane M. B., *Anal. Biochem.*, **305**, 287-289(2002)）を検討した。その結果、Sop_2-Sop_5 において酵素活性の測定に十分な感度が得られた。さらに、MBTH アジン法の反応条件(塩基、反応温度等)を変え、Sop_ns 定量に最適化な条件を検討した。反応時間が短い場合は 3 糖以上の Sop_ns の発色が Sop_2 よりも明らかに小さかったが、反応時間を伸ばすことで Sop_{2-5} は同程度の発色を示した。また、0.2－2 mM の範囲で Sop_ns 濃度と吸光度の関係は直線性を示した。以上から、MBTH アジン法は Sop_ns の定量に適した方法であると言える。

beta-1,2-glucooligosaccharide, colorimetric determination, reducing end assay

講演番号：2A26p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A26 会場

イネ由来β-グルコシダーゼ BGlu1 の糖転移反応の速度論的解析

Kinetic analysis of transglucosylation by rice ß-glucosidase BGlu1

○堀越 秀、佐分利 亘、松浦 英幸、森 春英 (北大院農)
○Shu HORIKOSHI, Wataru SABURI, Hideyuki MATSUURA, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】β-グルコシダーゼはβ-グルコシド加水分解酵素であり，糖転移反応も触媒する．糖質加水分解酵素ファミリーGH1 に分類されるイネ由来β-グルコシダーゼ Os3BGlu7 (BGlu1) は，Cairns らによる機能構造相関研究により，長鎖セロオリゴ糖特異的に作用する酵素と特徴付けられている．六糖まで重合度に応じて速度が増加し，これに対応する+5 までのサブサイト構造を有する．一方，サブサイト+1 の基質特異性は広く，本酵素はラミナリビオースや各種配糖体に作用する．天然の配糖体の中でピリドキシン 5′-*O*-β-グルコシド (PIN-Glc) に対し最も高い水解活性を示す．糖転移活性も確認されており，*p*-ニトロフェニルβ-グルコシド (*p*NP-Glc) およびピリドキシン (PIN) を受容体としてそれぞれ *p*NP-セロビオシドおよび PIN-Glc を生成する．また，イネでは体内においてホルモン様物質ツベロン酸 (TA, 12′-ヒドロキシジャスモン酸) の配糖化酵素として精製されており，サリチル酸β-グルコシド (SA-Glc) を糖供与体とする可能性が示されている．本研究では，BGlu1 の糖転移反応における糖受容体特異性を評価することを目的として速度論的解析を行った．

【方法, 結果および考察】組換え BGlu1 を大腸菌 Origami B (DE3) を用いて生産し，Ni-アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製して解析に使用した．基質 *p*NP-Glc，*o*NP-Glc および SA-Glc に対し水解と糖転移が確認された．アグリコンおよび Glc の生成速度を測定し，これらを全反応速度と加水分解速度，この差を糖転移速度した．各速度はグルコシル酵素中間体経由の糖転移反応の理論式によく従い，糖転移率 (糖転移と全反応の速度比) 50%を与える糖受容体濃度である K_{TG} は各基質に対してそれぞれ 48.1 mM，35.0 mM および 45.3 mM であった．次に 1 mM *p*NP-Glc(糖転移がほぼ認められない基質濃度)を糖供与体として用い，PIN および TA を糖受容体とした反応を解析した．K_{TG} はそれぞれ 5.93 mM，21.6 mM と求められ，いずれも配糖体に対する反応の K_{TG} よりも低かった．以上より，今回供試された化合物 5 種中で，PIN が最も良い糖受容体と判断された．なお上記の 1 mM *p*NP-Glc と PIN の反応において，アグリコン生成，加水分解および糖転移の反応の見かけの k_{cat} および K_m の挙動はシンプルなモデルでは説明できず，PIN がグルコシル酵素中間体に結合するだけでなく，遊離酵素および酵素基質複合体に結合することで阻害剤として働く反応の理論式によく従った．PIN がグルコシル酵素中間体および遊離酵素に結合する反応の解離定数はそれぞれ 8.24 mM および 5.83 mM と同程度であり，遊離酵素でも PIN がサブサイト+1 に結合すると示唆された．PIN が酵素基質複合体と結合する反応の解離定数は 181 mM であり，PIN のサブサイト+1 以外への親和性は低いと考えられた．

β-glucosidase, transglucosylation, glycoside hydrolase family 1

発表責任者：堀越　秀（shrks@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A26p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A26 会場

デキストラン デキストリナーゼの多糖合成に関与するアミノ酸の同定
Identification of the amino-acid residue of dextran dextrinase responsible for dextran production
○佐々木 優希、熊谷 祐也、貞廣 樹里、ラング ヴィーラヌッチ、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫(北大院農)
○Yuki SASAKI, Yuya KUMAGAI, Juri SADAHIRO, Weeranuch LANG, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】
Gluconobacter oxydans ATCC 11894 由来のデキストランデキストリナーゼ (DDase; 野生型酵素は 1284 アミノ酸で構成され、DDase1284 と表記する)はマルトオリゴ糖を基質とし、主にデキストラン(重合度>100)とイソマルトメガロ糖 (10<重合度<99)の異なる重合度の糖を合成する。我々はこれまでに、マルトヘキサオースとマルトヘプタオースの混合物 100 mg/ml を基質とした際の生成物量 (デキストラン：イソマルトメガロ糖 (mg/ml))が、DDase1284 では 20：20 であるのに対し、C 末端側から 382 残基削除した変異酵素 DDase902 では 6 : 41 であることを見出した。この先行研究から、DDase の C 末端側にはデキストラン合成に関与する構造因子があることが示唆された。本研究ではデキストラン合成を担う構造因子を明らかにすることを目的に変異酵素を作製し、生成物特異性の解析を行った。

【方法】
C 末端側から 358、361、362 および 363 残基を削除した変異酵素 (DDase926、DDase923、DDase922 および DDase921)を作製した。酵素の生産には大腸菌を用い、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。酵素反応はマルトヘキサオースとマルトヘプタオースの混合物 100 mg/ml を基質とし、酵素 0.10 U/ml、pH 4.2、35℃、6 時間の条件下で行った。反応生成物をメタノール沈殿法により分画した。メタノール 50%条件で得られた沈殿をデキストラン画分、80%条件で得られた沈殿をイソマルトメガロ糖画分とし、それぞれをフェノール硫酸法により定量した。

【結果】
各変異酵素が生成したデキストラン：イソマルトメガロ糖は、36.3：16.0 (DDase926)、32.8：20.7 (DDase923)、0.6 : 48.3 (DDase922)、1.9 : 48.3 (DDase921)だった。この結果から、DDase923 と DDase922 の間にデキストランとイソマルトメガロ糖の生成量が変化する境界があることが明らかになった。DDase923 を親酵素として、C 末端の Ser923 を Ala に置換した点変異酵素 (DDase923-S923A)では、生成したデキストラン：イソマルトメガロ糖が 3.5：57.9 であり、DDase922 と同様のメガロ糖優位型の生成物特異性を示した。この結果から Ser923 は DDase のデキストラン合成に関与する構造因子の一つであることが分かった。

Dextran, Megalosaccharide, Polysaccharide-producing enzyme

発表責任者：佐々木優希（ysasaki@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A26p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A26 会場

Flavobacterium johnsoniae 由来 GH26 マンナン 1,4-マンノビオシダーゼおよび GH97 α-ガラクトシダーゼの機能解析
Functional analysis of GH26 mannan 1,4-mannobiosidase and GH97 α-galactosidase from *Flavobacterium johnsoniae*
○佐分利 亘、森 春英 (北大院農)
○Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】β-マンナンは植物細胞壁を形成するヘミセルロースの構成多糖の一つである. 一部の細菌は, β-マンナン分解物 Manβ1-4Man をエピメラーゼとホスホリラーゼにより分解する経路を持つ. 本経路では, セロビオース 2-エピメラーゼ(CE; β-(1→4)結合からなる二糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基にエピメリ化)が Manβ1-4Man を Manβ1-4Glc にエピメリ化し, Manβ1-4Glc ホスホリラーゼ(MGP)が Manβ1-4Glc をα-Man1*P* と Glc に分解する. CE 生産菌 *Flavobacterium johnsoniae* は, CE 遺伝子 *Fjoh_4956* の周辺に MGP 遺伝子 *Fjoh_4955* の他, GH5 β-マンナナーゼ様遺伝子 *Fjoh_4958*, 2 つの GH26 β-マンナナーゼ様遺伝子 *Fjoh_4953* および *Fjoh4957*, GH97 α-ガラクトシダーゼ様遺伝子 *Fjoh_4959* を持つ. β-マンナナーゼおよびα-ガラクトシダーゼ様タンパク質はいずれもシグナル配列を有し, 菌体外で β-マンナン分解に貢献すると予想される. 本研究では, *F. johnsoniae* における菌体外酵素による β-マンナン分解機構を明らかにするため, 上記タンパク質のうち, GH26 Fjoh_4953 と GH97 Fjoh_4959 の機能を解析した.
【結果と考察】Fjoh_4953 および Fjoh_4959 の成熟タンパク質をコードする領域をそれぞれ pET-20b ベクターに挿入し, N 末端側に pelB 分泌シグナルを付加した. 大腸菌 BL21(DE3)により各タンパク質を 0.1 mM IPTG 存在下 18℃, 22 時間の条件で生産し, 菌体から組換えタンパク質を浸透圧ショックにより抽出, Ni キレーティングカラムにより精製した. Fjoh_4953 は, ローカストビーンガムやグアガムなどガラクトシル側鎖を持つガラクト β-マンナンより直鎖の β-マンナン (平均重合度 15) に高い活性を示し, Manβ1-4Man を主生成物として生じた. このことから, Fjoh_4953 はマンナン 1,4-マンノビオシダーゼと考えられた. 本酵素は直鎖 β-マンナンよりオリゴ糖基質によく作用し, 四糖に最も高い活性を示した. 多糖よりオリゴ糖に高い活性を示すことから, 本酵素はエンド型酵素による β-マンナンの分解により生じたオリゴ糖からの Manβ1-4Man の供給に働くと考えられた. Fjoh_4959 は, *p*-ニトロフェニル α-ガラクトシドおよびメリビオース(Galα1-6Glc)に高い活性を示したが, ラフィノース(Galα1-6Glα1-2βFru)に対する活性は低く, スタキオース(Galα1-6Galα1-6Glα1-2βFru)やガラクトマンナン分解物の Manβ1-4Manβ1-4[Galα1-6]Man および Manβ1-4Manβ1-4[Galα1-6]Manβ1-4[Galα1-6]Manβ1-4Man には作用しなかった. Fjoh_4959 はガラクトマンナンやその分解物のガラクトシル側鎖の分解ではなく, ガラクトマンナンの分解の過程で生じたα-(1→6)-ガラクトシル二糖の分解に寄与すると推定された.

mannan 1,4-mannobiosidase, alpha-galactosidase, *Flavobacterium johnsoniae*

発表責任者：佐分利 亘（saburiw@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A26p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A26 会場

Halobacillus halophilus 由来β-1,6-グルコシダーゼの機能解析
Characterization of beta-1,6-glucosidase from *Halobacillus halophilus*
○寺田 真衣、磯野 直人（三重大院生物資源）
○Mai TERADA, Naoto ISONO (Mie Univ.)

【目的】Glycoside Hydrolase Family 30 (GH30)にはβ-グルコシルセラミダーゼ, β-1,6-グルカナーゼ, β-キシロシダーゼなどの糖質加水分解酵素が含まれており, 構造によってさらにサブファミリー1~8 に分類されている. サブファミリー1 に属する酵素は主に動物で調べられており, β-グルコシルセラミダーゼであることが明らかとなっている. 一方, サブファミリー1 に属する原核生物由来の酵素については報告されていない. 本研究では, 好塩性細菌である *Halobacillus halophilus* DSM 2266 株由来の GH30 サブファミリー1 に属する酵素がβ-1,6-グルコシダーゼであることを明らかにし, その特性について調べた.
【方法・結果】大腸菌コールドショック発現系を用いてヒスチジンタグが付加された HBHAL_1426 タンパク質(53 kDa)を生産し, ニッケルカラムで精製した. HBHAL_1426 タンパク質はゲンチオビオースや *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド(pNPG)を加水分解し, グルコースを生成する反応を触媒した. グルコシルセラミド, ソホロース, ラミナリオリゴ糖, セロオリゴ糖, キシロビオース, α-グルコ二糖, キトオリゴ糖などに対しては活性を示さなかった. プスツランに対してはわずかに分解活性を示したため, 経時的に酵素反応液を採取して TLC で分析した. その結果, 時間経過に伴うグルコースの増加が観察されたが, その間のオリゴ糖の生成は認められなかった. また, pNPG に対する反応初期産物をアミドカラムを用いた HPLC 分析に供したところ, β-グルコースの生成が観察された. 以上のことから, HBHAL_1426 タンパク質はアノマー保持型の β-1,6-グルコシダーゼであることが明らかとなった. 本酵素の至適温度は 50 °C, 至適 pH は 6.2 であった. また, 50 °C 以下で 60 min 加熱した後も加熱前の 80 %以上の酵素活性を維持していた. ゲンチオビオースに対する k_{cat}, K_m, k_{cat}/K_m はそれぞれ, 139 s^{-1}, 5.86 mM, 23.7 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ であり, pNPG に対するパラメータはそれぞれ, 40.6 $s^{-1,}$ 15.4 mM, 2.63 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ であった. したがって、本酵素はゲンチオビオースに対する触媒反応効率が高いことが明らかとなった. ゲンチオビオースは苦味を呈する二糖である.ゲンチオビオース, ソホロース, ラミナリビオース, セロビオースの混合液に本酵素を加えて反応を行ったところ, ゲンチオビオースのみが分解された. また, 高濃度のグルコースに本酵素を加えて一晩反応を行ったところ、縮合反応によりゲンチオビオースが合成された. このように, HBHAL_1426 タンパク質はゲンチオビオースの選択的分解や合成に有用な酵素であることが示された.

β-1,6-glucosidase, GH30, gentiobiose

発表責任者：磯野直人（isono@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A26p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A26 会場

Aspergillus kawachii 由来β-フルクトフラノシダーゼの改変による 1-ケストース生産能向上と改変酵素の構造解析
Alteration of 1-kestose productivity of *Aspergillus kawachii* β-fructofuranosidase by mutagenesis and structure of the variant enzymes
○長屋 美香[1]、平野 勝紹[2]、藤井 匡[2]、栃尾 巧[2]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大院農、[2]物産フードサイエンス研究開発セ)
○Mika Nagaya[1], Katsuaki Hirano[2], Tadashi Fujii[2], Takumi Tochio[2], Atsushi Nishikawa[1], Takashi Tonozuka[1] ([1]Tokyo Univ. of A&T, [2]R&D Center, B Food Science)

【目的】フラクトオリゴ糖は、三糖 1-ケストース（Fru-β(2→1)-Fru-β(2↔1)α-Glc）や四糖ニストース（Fru-β(2→1)-Fru-β(2→1)-Fru-β(2↔1)α-Glc）などのフルクトースを構成糖とするオリゴ糖の総称である。このうち、1-ケストースは特にプレバイオティクスの機能が高いことが報告されている。麹菌 *Aspergillus kawachii* の生産するβ-フルクトフラノシダーゼ（以下 *Ak*FFase）は、糖質加水分解酵素ファミリーGH32 に分類される酵素で、高い糖転移活性を有しフラクトオリゴ糖の生産に有用な酵素である。我々は、*Ak*FFase を改変し 1-ケストースの生産能の高い変異酵素を取得し、変異酵素の立体構造解析を行ったので報告する。

【方法】*Ak*FFase の大腸菌発現系を用いて、活性中心付近を改変した酵素を構築し、1-ケストース生成がニストース生成より高い変異酵素を取得した。pET32a を用いた発現プラスミドによって、変異酵素を大腸菌で生産させ、Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、精製酵素を結晶化した。X線回折強度測定は、高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A ビームラインにて行った。*Ak*FFase の野生型を用いた分子置換法によってモデルを構築し、野生型酵素と変異酵素との構造を比較した。

【結果と考察】変異酵素を解析した結果、Gly85 を Trp に置換した G85W および His310 を Lys に置換した H310K では、ニストース生成に対する 1-ケストース生成の比が野生型より高いことが判明した。*Ak*FFase は、N 末端側の 5 枚の β シートから成る β プロペラドメイン、C 末端側の β サンドイッチ、および、これらのドメインをつなぐαヘリックスから成るリンカーより構成されており、活性中心は β プロペラドメインに存在する。Gly85 は活性クレフトの入り口に存在しており、側鎖が大きな Trp への置換によって立体障害が起こるため、G85W においては三糖である 1-ケストースより大きな糖は生成しないと考えられた。これに対して His310 は β プロペラドメインに存在するものの Gly85 とは全く異なる部位に位置しており、H310K の 1-ケストース生産能向上は G85W とは異なる機構によるものと考えられた。

Aspergillus kawachii, 1-kestose, β-fructofuranosidase

講演番号：2A26p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A26 会場

Penicillium multicolor が生産する 3 種の *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside 分解酵素が触媒する L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性の比較研究
Comparative substrate specificity study of transglucosylation of L-ascorbic acid catalyzed by three *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside hydrolases from *Penicillium multicolor*

○小出 麻奈[1]、菅沼 笙子[2]、仁戸田 照彦[2]、神崎 浩[2] ([1]岡山大・農、[2]岡山大院・環境生命)
○Mana KOIDE[1], Shoko SUGANUMA[2], Teruhiko NITODA[2], Hiroshi KANZAKI[2] ([1]Fac. Agr., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】我々は *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPG)分解酵素が L-アスコルビン酸 (AA)への 配糖体化能をもつかどうかの検討を行う中で，AA の配糖体化には位置選択性や基質特異性に多様性があることを明らかにしてきた。その過程で *Penicillium multicolor* 由来β-グルコシダーゼ酵素製剤の精製を行い，分子質量 102kDa と 117kDa の *p*NPG 分解酵素 (PmβGlcase102K，PmβGlcase117K)を見出していた。前者は芳香環を有する配糖体に高い基質特異性を示し，後者はそれらに加えてセロオリゴ糖やβ-グルコ二糖配糖体にも高い基質特異性を示すことが分かっている [1)]。再度，同酵素製剤について精製を行ったところ，上記 2 種の *p*NPG 分解酵素とは糖転移活性に関する基質特異性，配糖化位置選択性及び活性の強さが異なる *p*NPG 分解酵素が見出された。今回，新たに精製した *p*NPG 分解酵素の糖転移反応における基質特異性を中心とした性質検討について報告する。
【方法・結果】天野エンザイム社製アロマーゼを陰イオン交換クロマトグラフィー，疎水性クロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより，SDS-PAGE 上で単一バンドとして確認できるまでに精製し，48kDa の *p*NPG 分解酵素を得た。N 末端アミノ酸配列解析結果から，本酵素は鶴喰らによって報告のあったβ-ジグリコシダーゼ [2)]であると推定され，PmβGlcase102K，PmβGlcase117K のいずれとも異なる遺伝子によってコードされていることが分かった。そこで，*p*NPG 分解活性を揃え，AA を糖受容体，*p*NPG または cellobiose を糖供与体として 37ºC で 1 時間反応を行い，生成した AA 配糖体を定量することで，β-ジグリコシダーゼにおいてこれまでに報告のなかった糖転移活性の測定を行った。その結果，*p*NPG に比べて cellobiose を糖供与体とした時の方が AA 配糖体生成量は多かった。また，アスコルビン酸 2βグルコシドとアスコルビン酸 6βグルコシド (AA6βGlc)両方の生成が確認された。一方，同酵素製剤由来の PmβGlcase102K や PmβGlcase117K は *p*NPG を糖供与体とした時の方が AA 配糖体生成量は多く，AA6βGlc を優先的に生成する。これらのことから，同じ菌株由来の *p*NPG 分解酵素であっても *p*NPG や cellobiose に対する基質特異性の違いで異なるグループに細分類できると言え，別の遺伝子にコードされた基質特異性の異なる *p*NPG 分解酵素が同じ菌株から複数生産されているという興味深い事実が分かった。

1) 菅沼・寺坂・仁戸田・神崎，日本農芸化学会 2017 年度京都大会要旨集，講演番号 2J33p14
2) K. Tsuruhami *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70** (3), 691-698 (2006),
Isolation and Characterization of a β-Primeverosidase-Like Enzyme from *Peicillium multicolor*

β-glucosidase, L-ascorbic acid glucoside, β-diglycosidase

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A26p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A26 会場

ゲノムマイニングによって取得した麹菌由来の新規キシラナーゼ(XynB)の酵素学的諸性質
Purification and enzymatic characterization of a novel xylanase (XynB) from *Aspergillus oryzae*
○渡部 昭、小幡 公平、太田 夏野子、氏家 成隆、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院・農・生物産業創成）
○Akira WATANABE, Kohei OBATA, Kanoko OHTA, Seiryu UJIIE, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】我々は、セルロース系バイオマス高分解酵素の取得を目的に、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元にゲノムマイニングの手法でこれまで未解析の新規セルラーゼ、ヘミセルラーゼの機能解明をこれまで行ってきており、作製したセルラーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規なエンドグルカナーゼ、β-グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた（１、２、３、４）。今回は、セルラーゼに比べて報告例の少ないヘミセルラーゼのうち Glycoside Hydrolase Family 10(GH10)に属する新規キシラナーゼ(XynB)を新たに見出したのでその酵素学的諸性質について報告する。

【方法】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top、AspGD:http://www.aspgd.org/)を用いて探索し、麹菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応で目的 DNA 断片を増幅後、麹菌高発現用ベクター(pNGA142)に組み込み作製した推定キシラナーゼ遺伝子の網羅的高発現株から取得した新規キシラナーゼ(XynB)を、硫安塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し酵素学的諸性質を調べた。

【結果】XynB は主として硫安 50～65%沈殿画分に回収されたので、その後 Super-Q Toyopearl 650M 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに２回供することで精製した。精製した XynB は、SDS-PAGE による解析ではゲノム情報から推定される 35kDa の位置に単一バンドとして検出された。また、本酵素高発現株を用いた基質 AZCL-Xylan によるプレートアッセイでは、本酵素は同じ麹菌由来で既に報告のある GH10 に属する２つの酵素(XynF1、XynF3)と同等の活性を示した。この他の本酵素の諸性質を併せて報告する。

（１） 工藤ほか、2010 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ２５６
（２） 工藤ほか、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ４４
（３） 工藤ほか、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ７９
（４） 渡部ほか、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ９２

xylanase, *Aspergillus oryzae*, genome mining

講演番号：2A26p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A26 会場

シロアリ腸内共生細菌由来 GH11 キシラナーゼの生産と機能解析
Production and characterization of a GH11 xylanase from a symbiotic bacterium in the termite gut

○北本 真理奈[1]、徳田 岳[2]、渡辺 裕文[3]、有岡 学[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]琉球大・熱生研、[3]農研機構・生物研)
○Marina Kitamoto[1], Gaku Tokuda[2], Hirofumi Watanabe[3], Manabu Arioka[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]TBRC, Univ. of the Ryukyus, [3]Nat. Inst. Agrobiol. Sci., NARO)

【背景と目的】シロアリは高い木質系バイオマス分解能力を持つ昆虫として知られている。高等シロアリにおいては、近年メタトランスクリプトーム解析により腸内に共生する細菌群からセルラーゼやヘミセルラーゼをコードする遺伝子群が発見されており、これが宿主の高いバイオマス資化効率に寄与するのではないかと予想されている。このような酵素はバイオエタノール生産におけるバイオマス糖化の効率化に貢献する可能性があると期待されるが、その酵素学的性質については解析がほとんど行われていない。本研究では高等シロアリであるタカサゴシロアリ *Nastitermes takasagoensis* の後腸において著しく高い発現を示す共生細菌由来の推定キシラナーゼについて、大腸菌 *E. coli* を用いた生産を行い、酵素学的性質について解析した。
【方法及び結果】*N. takasagoensis* の腸内に共生する細菌から単離された遺伝子がコードするキシラナーゼ (以下、NtSymX11) は、分子系統解析により GH ファミリー11 に属するキシラナーゼと近縁であると予想された。またドメイン解析により、NtSymX11 は N 末端側から GH ファミリー11 触媒ドメイン、それに続く 2 つの CBM36 ドメインという 3 つのドメインを持つことが分かった。
NtSymX11 について pRSET ベクターを用いて大腸菌 *E. coli* での発現を行ったところ、発現株のコロニーを用いたハロアッセイでキシランの分解が確認された。生産された NtSymX11 について Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製を行い、基質特異性、反応生成物、至適条件、安定性などについて解析した。その結果、NtSymX11 はキシランに対して特異的な活性を示し、主な反応生成物はキシロビオース (X2) およびキシロトリオース (X3) であることがわかった。至適条件は pH 6.0-6.5、35℃-45℃であった。また NtSymX11 に含まれる CBM ドメインを除去して発現させたところ、酸性 pH における安定性および熱安定性が向上した。一方で、酵素のカイネティクスを測定したところ、CBM の除去によって触媒効率が低下した。不溶性キシランを用いた酵素反応に Ca^{2+}イオンを加えたところ、NtSymX11 の活性が顕著に上昇した。一方で CBM を除去した酵素については活性に大きな変化が見られなかったことから、Ca^{2+}イオンの存在下において NtSymX11 が持つ CBM と基質との結合性が上昇することが示唆された。現在 Ca^{2+}と基質との結合の関連について、さらなる解析を行っている。

termite, xylanase, carbohydrate-binding module

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A26p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A26 会場

ヒト腸内細菌 *Bacteroides plebeius* 由来の変異型キシラナーゼ 10B（Xyn10B)の特性解析

Characterization of mutant xylanase 10B(Xyn10B) from human intestinal bacteria *Bacteroides plebeius*.

○大村 佳孝[1]、松本 貴良[2]、小黒 弘貴[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Yoshitaka Omura[1], Takara Matsumoto[2], Hiroki Oguro[1], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology, [2]Maebashi institute of technology)

【背景・目的】ヒト腸内細菌 *Bacteroides plebeius* はゲノム DNA 上に複数のキシラナーゼをコードしている。そのうちの 1 つである Xyn10B は、糖質加水分解酵素（GH）ファミリー10 に属する触媒ドメインが約 150 アミノ酸からなる 2 つの Carbohydrate-binding module(CBM)と推定される挿入配列によって前半部分と後半部分の 2 つの分断されている。

本研究では、Xyn10B の触媒ドメインの前半部分と後半部分を同一菌体内で別々に発現させ、2 つのタンパク質が会合し、キシラーゼ活性の有無を解析することを目的とする。

【方法】*B. plebeius* 由来 Xyn10B の触媒ドメインの前半部分と後半部分を同一大腸菌内で別々に発現させた。発現したタンパク質をアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、ゲルろ過クロマトグラフィにより分子量を決定した。至適温度、至適 pH、熱安定性、pH 安定性、サーマルサバイバル、基質特異性、*K*m、*V*max、キシロオリゴ糖およびキシランからの分解産物の解析を行った。

【結果・考察】ゲルろ過から、変異型 Xyn10B の分子量は 58.03 *m*/kDa であった。これはアミノ酸配列から推定される分子量 *m*/kDa とほぼ一致する。さらに変異型 Xyn10B がキシラナーゼ活性を持つことと Native-PAGE でバンドが 1 本であったことから、同一菌体内で別々に発現した Xyn10B の前半部分と後半部分が会合していると思われる。Xyn10B と同じ構造を持つ *P. copri* の Xyn10B でも同様な現象を確認している。変異型 Xyn10B の Beechwood xylan を基質とした場合の至適温度は 50℃、至適 pH は pH6.0 であった。熱安定性は 20～50℃の間で約 90%以上の活性を示し、pH 安定性は pH3.0～11.0 の間で約 90%以上の活性を示した。半減期($t_{1/2}$)は 50℃で 769.7 分、55℃で 105.9 分であった。*K*m 値、*V*max 値はそれぞれ 44.1 mg/ml と 344.8 μmol/min/mg であった。Beechwood xylan、Birchwood xylan、Oat-spelt xylan を基質とした時の比活性は、それぞれ 55.0±4.0 U/mg、64.9±3.0 U/mg、26.8±3.1 U/mg であった。CMC、*p*NPC、*p*NPX、*p*NPG、*p*NPAf に対する活性は見られなかった。金属イオン添加試験では、試験した全ての金属イオンにおいて活性の上昇が見られ、EDTA を添加した場合では活性の低下が見られた。キシロオリゴ糖（X2～X6）を用いた TLC による分解産物の解析では、X2 は少量の X1 に、X3 は X2 と X1 に、X4 は X3~X1 に X5 と X6 は X4~X1 にそれぞれ分解された。Beechwood xylan を用いた場合では、少量の X1 と X2~6 に分解され、主な分解産物は X2 と X3 であった。このことから、変異型 Xyn10B はエンド型のキシラナーゼであることが示唆された。

xylanase, glycoside hydrolase, GH10

発表責任者：大村佳孝（m1666003@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2A26p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A26 会場

Euglena gracilis Z 由来 β-1,3-oligoglucan phosphorylase ホモログの機能解析と比較

Comparative analysis among homologues of ß-1,3-oligoglucan phosphorylase from *Euglena gracilis* Z

○中越 麻里菜、谷 修二、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生環）
○Marina NAKAGOSHI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka pref. Univ.)

【背景と目的】グルコース（Glc）がβ-1,3 結合したオリゴ糖（ラミナリオリゴ糖，LO）には様々な生理活性が期待されており，安価な合成法が望まれている。本研究では，LO を酵素的に合成する方法としてホスリラーゼに注目した。ホスホリラーゼは反応位置特異性が極めて厳密である。また可逆反応酵素であり，反応系のリン酸濃度を調節することにより容易に平衡を合成反応側に傾けることができるため，選択的なオリゴ糖の合成への応用が期待されている。β-1,3 グルカンに作用するホスホリラーゼとして，Laminaribiose phosphorylase (LBP) とβ-1,3-oligoglucan phosphorylase (LOP) が一般的に知られており，前者はラミナリビオースに，後者は三糖以上の LO に対する加リン酸分解とその逆反応を触媒する酵素である。

Euglena gracilis Z 由来の LOP (EgLOP) は LBP 活性を有する LOP であることから，単独で安価な Glc からの LO 合成が期待できるが，安定性に問題がある。当研究室において同定された EgLOP の cDNA から推定されるアミノ酸配列は既知のホスホリラーゼとの相同性を示さなかったが，ゲノム解析により存在が推定されている機能未同定のタンパク質群と相同性が確認された。これら機能未同定タンパク質群のうち *Flavobacterium aquatile* と *Treponema caldarium* 由来のオルソログ（FaLOP, TcLOP）が LOP 活性を有することを明らかにした。そこで，本研究では，これら 3 つの LOP について比較を行うことを目的とした。

【方法と結果】EgLOP および FaLOP，TcLOP を大腸菌で C 末端側に His-tag を融合したタンパク質として生産させ，アフィニティークロマトグラフィーにより単一になるまで精製した。EgLOP，FaLOP，TcLOP の至適温度はそれぞれ 37˚C，30˚C，55˚C であり，温度安定性はそれぞれ 40˚C，30˚C，50˚C 以下，30 分処理で 80%以上の活性を保持していた。FaLOP は EgLOP に比べ温度による影響を受けやすいが, TcLOP は EgLOP と比較すると温度安定性の高い酵素であることが明らかとなった。また, EgLOP は 4˚C での保存において 1 週間程度で 80%以下の活性になるのに対し, FaLOP や TcLOP は 1 か月後でも 80%以上の活性を保持していたため，EgLOP よりも保存安定性が高い酵素であることが明らかとなった。今後，基質特異性・加リン酸分解反応と脱リン酸合成反応の双方向のカイネティックについて検討し比較を行う予定である。

β-1,3-oligoglucan, phosphorylase, laminarioligosaccharide

講演番号：2A26p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A26 会場

組換えヒト膵臓α-アミラーゼ（rHPA）の大腸菌発現，諸性質および活性に対する阻害物質の効果

Expression in E.coli and some enzymatic properties of recombinant human pancreas α-amylase (rHPA) and inhibition of its activity by acarbose and wheat proteinaceous inhibitors.

○小根田 洋史（長田産業株式会社）
○Hiroshi Oneda (Nagata sangyo)

【はじめに】糖尿病患者数は生活習慣と社会環境の変化に伴い増加の一途を辿っている。近年、糖尿病およびその予備軍である糖代謝異常における厳格な血糖値管理の重要性が認識されており、糖質の消化吸収にかかわる酵素の阻害物質を用いて食後の急激な血糖値上昇を抑制する試みが多くなされている。このような阻害物質の探索、また構造機能相関研究には酵素の大量調製が不可欠であり、その方法は低コストかつ簡便なものが望ましい。従来、組換えヒト膵臓αアミラーゼ(rHPA)の調製には酵母発現系が用いられているが、今回、大腸菌発現を試みた。
【方法・結果】アミラーゼ活性はブルースターチを基質として用いて測定した。ヒト膵臓 cDNA から AMY2A 遺伝子をクローニングし、大腸菌 pET 発現系により発現させたところ、不活性封入体を形成した。再生条件を検討した結果、1 M Arg 存在下、pH 9.3, 4℃, 70 h 処理により、2.22 mg のタンパク質を含む不活性封入体から 0.942 mg の rHPA が再生し、疎水性相互作用 HPLC カラムを用いて 0.621 mg の均一標品を得た。N 末端アミノ酸分析により精製酵素は N 末端に Met が付加しており、MALDI-TOF-MS 分析により分子量は 56006.06 と求められた。精製酵素の比活性は 692 U/mg であった。37℃における至適 pH は 7.4 (pK1=5.9, pK2=8.9)、また pH 7.0 において 30 分処理により活性の 50%を失う温度(T50)は 61.8℃と求められた。pH 7.0, 37℃, eo=0.44 nM においてアカルボースの阻害効果を検討したところ、活性の 50%を阻害する濃度(IC50)は 0.71 μg/ml と求められた。小麦由来のアミラーゼインヒビター標品(0.19 アミラーゼインヒビター(1)を主成分(46.7%)とするタンパク質性アミラーゼインヒビター群)の阻害効果を同様に測定したところ、IC50 は 0.43 μg/ml と求められた。今回検討した rHPA の酵素化学的性質および阻害物質の効果と native HPA で同様に検討した結果に有意差はみられなかった。
1) 小根田洋史，日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨 4D010

amylase, refolding, inhibitor

発表責任者：小根田洋史（oneda@nagatasangyo.co.jp）

講演番号：2A26p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A26 会場

リュウキュウイノモトソウ由来 LysM ドメイン多連結体および多連結体融合キチナーゼの抗真菌活性
Antifungal activities of LysM domain multimers and the multimers-linked chitinases

○高島 智也[1]、砂川 陵[2]、上地 敬子[2]、平良 東紀[2]([1]鹿児島大院連農、[2]琉球大農)
○Tomoya TAKASHIMA[1], Ryo SUNAGAWA[2], Keiko UECHI[2], Toki TAIRA[2] ([1]Kagoshima Univ. United Gra. Sch. of Agr. Sci., [2]Ryukyu Univ.)

【目的】真菌は植物病原菌の 8 割を占め，動物には真菌症を引き起し，食品を腐敗させ，居住空間ではハウスダスト・アレルギーの主原因となるため，安全で有効な抗真菌剤が求められている。しかしながら，これまでに開発されている抗真菌剤は動植物への副作用および薬剤耐性菌の出現などの問題が指摘されている。そのために安全で有効な抗真菌剤の開発が求められている。植物が生産するキチナーゼは真菌細胞壁中のキチンを直接加水分解することにより，真菌の感染・増殖を抑止することから，抗真菌剤としての利用が期待される。

リュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ-A (PrChiA) は糖質結合モジュールファミリー50 (CBM50) に分類される 2 つの LysM ドメインと糖質加水分解酵素ファミリー18 (GH18) に属する触媒ドメイン (CatD) がリンカーで連結された構造を持ち，GH18 キチナーゼでは他に類をみない強い抗真菌活性を示す。PrChiA の LysM ドメインを 1 つ欠損させると抗真菌活性は大きく低下し，触媒ドメイン単独では抗真菌活性が消失することが報告されている。そこで PrChiA の有する LysM ドメインの連結数によるキチナーゼの抗真菌活性の影響について調べた。

【方法】 PrChiA の N 末端側から 2 番目に位置する LysM ドメインをベースに LysM ドメインが 2 から 6 連結した多連結体，さらに LysM ドメイン多連結体を PrChiA の CatD とガジュマル乳液由来 GH19 キチナーゼ (GlxChiB) の CatD のそれぞれに融合した組み換えタンパク質を大腸菌により作成した。抗真菌活性は供試菌株として *Trichoderma viride* を用い，以下のように行った。予め PDA 培地上に生育させた *T. viride* の菌糸を寒天ごと直径 4mm のディスク状にくり抜き，新たな PDA 培地に接種し，5 µL のサンプル（試験区）または滅菌水（対照区）を菌糸を含む寒天ディスクに添加した後，25℃で 12 時間培養した。対照区と試験区における菌糸の生育面積を測定し IC_{50} を求めた。

【結果と考察】作製した LysM ドメインのみの多連結体によって菌糸の生育阻害が認められ，多連結体 X が最も強い抗真菌活性（IC_{50}=248 pmol）を示した。野生型 PrChiA の IC_{50} は 309 pmol であったのに対し多連結体 Y 融合 PrChiA_CatD の IC_{50} は 70 pmol となり，LysM ドメインの連結数を増やすことにより PrChiA の抗真菌活性が強化されることが分かった。一方で，CBM18 をキチン結合ドメインとして有する GlxChiB の CBM18 ドメインを LysM ドメインで置き換えた結果，IC_{50} は同程度であり，GH19 キチナーゼの抗真菌活性の強化はできなかったが，CBM18 を LysM ドメイン (CBM50) で補完できることが分かった。

antifungal, chitinase, LysM domain

講演番号：2A26p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A26 会場

ガジュマル乳液由来キチナーゼ（GlxChiB）と *Bacillus circulans* KA304 由来キチナーゼ（FnChiI）の抗真菌活性における各ドメインの役割

Roles of each domain in antifungal activity of gazyumaru latex chitinase B (GlxChiB) and *Bacillus circulans* KA304 chitinase (FnChiI).

○神初 弾[1]、矢野 成和[2]、上地 敬子[1]、平良 東紀[1]（[1]琉球大・農、[2]山形大院・理工）
○Dan KOZOME[1], Shigekazu YANO[2], Keiko UECHI[1], Toki TAIRA[1] ([1]Univ. of the Ryukyus, [2]Yamagata Univ.)

【目的】植物が産生するキチナーゼは病原性真菌の主な細胞壁成分であるキチンを分解することによって真菌の侵入および生育を抑制する生体防御タンパク質と考えられている。本研究室でクワ科イチジク属ガジュマルの乳液より単離した GlxChiB は，キチン結合ドメインとして carbohydrate binding module family 18（CBM18）と触媒ドメインである glycoside hydrolase family 19 (GH19) を有するキチナーゼであり，極めて強い抗真菌活性を示す。一方，細菌由来の GH19 キチナーゼも抗真菌活性を示すことが報告されている。*Bacillus circulans* KA304 の培養濾液から単離されたキチナーゼ（FnChiI）はスエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）のプロトプラスト形成に寄与する。FnChiI は N 末端の 2 つのキチン結合性を有する Fibronectin type III 様ドメイン（FnIIID）と C 末端領域の GH19 触媒ドメインから構成されている。本 GH19 ドメインは上記の GlxChiB の *loopful* 型 GH19 と比較して，3 つのループ領域を欠失している *loopless* GH19 である。FnIIID を欠損した FnChiI のプロトプラスト形成能が極端に低下することから、FnIIID は FnChiI による真菌細胞壁キチンの分解に寄与していると考えられる。FnChiI は *Trichoderma viride* に対する抗真菌活性を有していた。本研究では，GlxChiB と FnChiI の抗真菌活性の強度を比較すると共に，各ドメインの抗真菌活性に対する寄与とキチン結合ドメインの種類および触媒ドメインの種類よる抗真菌活性の違いについて調べた。

【方法】 大腸菌を用いて生産した組換え GlxChiB、FnChiI、両キチナーゼのキチン結合ドメイン欠失変異体、およびドメインスワッピング体の *T. viride* に対する抗真菌活性の強度を比較した。定量的抗真菌活性測定法として菌糸再伸長阻害活性試験法を用い，IC_{50} 値を算出した。

【結果と考察】GlxChiB と FnChiI の IC_{50} はそれぞれ 1.16 μM および 5.52 μM であった。GlxChiB の *loopful* GH19 のみ及び FnChiI の *loopless* GH19 のみの IC_{50} は 3.92 μM および 61.3 μM となった。FnChiI の *loopless* GH19 に CBM18 を融合させると，*loopless* GH19 のみより抗真菌活性が 5 倍に上昇した（12.26 μM）。これらのことから、全長で比較すると GlxChiB の抗真菌活性は FnChiI の 5 倍，触媒ドメインのみで比較すると *loopful* GH19 の抗真菌活性は *loopless* GH19 の 15 倍あり，*loopless* GH19 の抗真菌活性の発揮にはキチン結合ドメインの寄与が大きいことが分かった。一方，GlxChiB の *loopful* GH19 に FnIIID を融合させた場合，*loopful* GH19 のみより抗真菌活性が 1/2 に低下した。β-キチンナノファイバーに対しての結合活性は FnIIID および CBM18 を持つタンパク質は結合活性を示したが，それらを欠失した変異体は結合活性を示さなかった。以上のことから，キチナーゼの抗真菌活性においてキチン結合性が付与されればいいわけでは無く，適切なキチン結合ドメインと触媒ドメインの組合せがあることが示唆された。

Chitinase, Antifungal activity, Chitin-binding

発表責任者：平良東紀（tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2A26p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A26 会場

“*Cellulosimicrobium* sp. NTK2”が生産する菌体外キチン分解酵素の解析
Chitin degrading extracellular enzymes secreted by "*Cellulosimicrobium* sp. NTK2"
○仁木 大輔[1]、美藤 友博[2]、清水 克彦[3]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農、[3]鳥取大産学)
○Daisuke Niki[1], Tmohiro Bito[2], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[2] ([1]Grad. Sch. Agric, Tottori Univ., [2]Fac. Agric, Tottori Unv., [3]Org. Reg. Ind. Acad. Coop, Tottori Univ.)

【目的】キチンは地球上でも生産量が多く，セルロースに次ぐバイオマス資源として期待がかけられている。しかしその殆どが，強固な構造を持つα-キチンで難分解性を示す。従って，分解には繁雑な工程や環境負荷等の問題が残されている。微生物によるα-キチン分解は直接的である一方，酵素化学的な分解は困難であり，その効率は微生物に到底及ばない。従って，微生物によるα-キチン分解の分子機構を知ることは，温和な条件でのα-キチン分解技術の確立に繋がると考えられる。我々はこれまでに，カニ殻廃棄物の迅速な堆肥化を可能とする完熟コンポストから，α-キチンを直接分解する放線菌，*Cellulosimicrobium* sp. NTK2（NTK2 株）を単離した。本研究では，α-キチンの酵素による直接分解を目指し，本菌が生産するキチン分解に関わる菌体外タンパク質を解析した。
【方法及び結果】NTK2 株の培養上清における SDS-PAGE 及びキチンザイモグラフィー解析により，キチン分解に関与すると思われる菌体外タンパク質が複数確認された。N 末端アミノ酸配列解析により，これらの菌体外タンパク質のうち 4 種類を同定することができ， 3 種類は family 18 Chitinase，もう一つは GlcNAc-binding protein であることが明らかとなった。またキチン分解酵素のうち，分子質量が異なる 2 つのタンパク質（40 及び 55 kDa）からは，同じ N 末端アミノ酸配列が検出された。NTK2 株の全ゲノムを解析した結果，同定された菌体外タンパク質以外にも，6 種類の Chitinase と 1 種類の GlcNAc-binding protein の遺伝子の存在が明らかとなった。しかし，40 及び 55 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列はゲノム上に 1 つしか存在せず，55 kDa タンパク質の C 末端側の切断によって 40 kDa タンパク質が生じると考えられた。菌体外で確認された Chitinase の異種発現系を構築して Zymography を行った結果， 40 kDa の Chitinase 以外で，NTK2 株が生産する Chitinase と同じ分子量の位置に活性が確認された。現在，全てキチン分解に関わるタンパク質の異種発現系の構築を試みており，今後は全てのタンパク質を使ったα-キチン分解を評価していく予定である。

chitinase, zymogrphy, chitin binding domain

発表責任者：有馬二朗（arima@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A26p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A26 会場

Amino acid residues to govern substrate recognition of trehalose-6-phosphate hydrolase from *Streptococcus mutans* NBRC13955

○Patcharapa KLAHAN, Masayuki Okuyama, Asako Kikuchi, Takayoshi Tagami, Atsuo Kimura (Grad Sch Agri, Hokkaido Univ)

Introduction: Trehalose-6-phosphate hydrolase, exhibiting less activity to trehalose, strictly recognizes trehalose-6-phosphate (T6P) and hydrolyzes the α,α-1,1-glucosidic linkage. This enzyme is classified into a glycoside hydrolase family 13 (GH13), and its putative gene is found in SMU_2037 of *Streptococcus mutans*, a bacteria causing the dental caries. In this study, we clarify the substrate recognition of *S. mutans* trehalose-6-phosphate hydrolase (SmTre13) by characterizing the candidate residue-mutated enzymes.

Methods and Results: A gene encoding SmTre13 was expressed in *Escherichia coli* cells. The recombinant enzyme with His-tag, which was purified using Ni-affinity chromatography, displayed the high activity toward T6P, the slight activity to *p*-nitrophenyl α-glucopyranoside (*p*NPG), quite small activity to trehalose, sucrose, and isomaltose, and no activity to isomaltotriose, maltose, or sucrose-6-phosphate. These findings indicate that a recombinant SmTre13 is a typical trehalose-6-phosphate hydrolase. To reveal the substrate recognition of SmTre13, we constructed its V192A. Val192 is equivalent to a residue involved in glucosidic linkage specificity in GH13 exo-α-glucosidases. V192A decreased by 45 and 4.5 times in the k_{cat}/K_m values for T6P and *p*NPG, respectively, while it increased by 6.4 times in that for sucrose. On the other hand, the basic residues of Lys211, Lys273 and Lys281 of SmTre13, which are conserved in the subfamily of trehalose-6-phosphate hydrolase (GH13_29), are believed to recognize a phosphate group of T6P. The generated K211Q, K273Q and K281Q substantially decreased the k_{cat}/K_m values for T6P while they maintained about 80% k_{cat}/K_m value toward *p*NPG. These results suggest that Val195 and three basic residues (Lys211, Lys273 and Lys281) of SmTre13 are associated with the recognition of α,α-1,1-glucosidic linkage and phosphate group of T6P, respectively.

trehalose-6-phosphate hydrolase, *Streptococcus mutans*, glycoside hydrolase family 13

発表責任者：KLAHAN Patcharapa（patchakl@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A26p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A26 会場

古細菌トレハラーゼの N 末端領域の機能
Function of N-terminal region in archaeal trehalase
○坂口 政吉[1]、久米 杏奈[1]、湯浅 充洋[1]、本田 翔太郎[1]、小山 文隆[1]、川喜田 正夫[2]([1]工学院大先進工、[2]東京都医学研)
○Masayoshi Sakaguchi[1], Anna Kume[1], Mitsuhiro Yuasa[1], Shotaro Honda[1], Fumitaka Oyama[1], Masao Kawakita[2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

【目的】原核生物の GH15 ファミリー酵素は，N 末端ドメインと C 末端触媒ドメインで構成される。最近，我々は細菌グルコアミラーゼの N 末端ドメインの N 末端領域が酵素全体のフォールディングや活性部位の形成に関与していることを報告した。一方で，好酸性古細菌の染色体 DNA 上に存在するグルコアミラーゼ様遺伝子産物がトレハラーゼ活性を持つことを報告した。この遺伝子産物も GH15 ファミリーに分類され，このトレハラーゼも N 末端ドメインと C 末端触媒ドメインで構成されると推定している。また，この酵素の N 末端領域 32 残基を欠損すると，大腸菌発現系で不溶性タンパク質となることが観察されている。しかし，両酵素の N 末端領域間の配列類似性は低い。本研究では，古細菌トレハラーゼの N 末端領域の欠損体および変異導入体を構築，解析し，古細菌トレハラーゼの N 末端領域の役割を調べることを目的とした。
【方法】古細菌 *Thermoplasma volcanium* トレハラーゼを研究対象として，部分的に N 末端領域を欠損した遺伝子産物，そして変異導入した遺伝子産物を，大腸菌を宿主として発現させ，電気泳動およびトレハロース分解活性で評価した。
【結果】N 末端領域を 5，10，20 残基欠損した欠損体(Δ5，Δ10，Δ20)を大腸菌にて発現させた。Δ5 はほぼ野生型同様可溶性酵素として取得できたが，Δ10 および Δ20 では発現したタンパク質のほとんどが不溶性であった。そこで，Δ5 の 6 番目から 10 番目のアミノ酸残基を一つずつアラニン残基へ変換した変異体を作製し，評価した。その結果，Δ5 Y9A 変異体では可溶性酵素としての取得量が大きく減少することがわかった。次に，該当するアミノ酸側鎖のフォールディングに対する影響を調べるために，Δ5Y9X を作製し，評価した（Y9S，Y9T，Y9F，Y9W，Y9V，Y9L，Y9I)。芳香環をもつ変異体(Y9F，Y9W）や疎水性側鎖を持つ変異体（Y9V，Y9L）の可溶性タンパク質取得量は減少しなかった。しかし，水酸基をもつ Y9S および Y9T では，その取得量が著しく減少する結果を得た。これらの結果は，古細菌トレハラーゼのフォールディングには，推定 N 末端ドメインの N 末端領域に，芳香環や疎水性側鎖をもつアミノ酸が必要であることを示唆した。今後，これらの再評価と共に，トレハロース分解活性や温度に対する特性を調べる予定でいる。

archaeal GH15 trehalase, N-terminal region, inclusion body

発表責任者：坂口政吉（bt11532@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2A26p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A26 会場

Klebsiella pneumoniae pullulanase と cyclodextrin の相互作用様式の解明
Elucidation of mechanism of interaction between *Klebsiella pneumoniae* pullulanase and cyclodextrin
○坂 直樹[1]、田中 啓一郎[2]、山野 小波[2]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1]、岩本 博行[2]、三上 文三[1]([1]京大院農・応用生命、[2]福山大・生命工)
○Naoki SAKA[1], Keiichiro TANAKA[2], Konami YAMANO[2], Kimihiko MIZUTANI[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Hiroyuki IWAMOTO[2], Bunzo MIKAMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Fukuyama Univ.)

【目的】
Klebsiella pneumoniae pullulanase (KPP)はα-1,6-結合を加水分解するアミラーゼであり、5 つのドメイン(N1、N2、N3、A、C)から構成されている。これまでに KPP の生化学的性質が多く報告されているが、その中でも阻害剤 cyclodextrin (CD)との相互作用に関して興味深い報告がなされた。KPP と三種類の CD（α、β、γ)との阻害を比較すると、β-CD がα、γ-CD と比べて 100 倍強く阻害し、熱量測定の結果からβ-CD の結合には疎水効果による寄与が推定されている。本研究では KPP と三種類の CD との複合体の X 線結晶構造解析を行い、相互作用様式の構造的な相違を明らかにすることにした。
【方法】
KPP/CD 複合体結晶は 0.1~10 mM の濃度でα、β、γ-CD との共結晶化により得た。凍結法により SPring-8 で分解能 1.98~2.58 Å までの回折データを収集した。構造の精密化には PHENIX を用い、モデル作成には COOT を用いた。
【結果】
KPP/CD 複合体において、CD は N1 ドメインと活性部位の二か所に結合しており、N1 ドメインでは CD の種類と濃度による差は生じていなかったが、活性部位への結合には CD の種類によって濃度依存性に差が生じていた。活性部位における CD の相互作用の差を調べると、いずれの CD もサブサイト+2、+1 に結合し、その結合様式に大きな差は見られないが、CD の環の内部と相互作用している Phe746 との相互作用には大きな差が生じていた。α-CD との間には相互作用が多く存在していたが、同時に近すぎる相互作用も存在した。またγ-CD は環が大きいために相互作用がほとんど存在していなかった。一方で、β-CD は適切な距離で Phe746 と相互作用していた。Phe746 の重要性を調べるために Phe746 を Ala に変異した F746A 変異体を作製し、CD の阻害定数を測定した結果、F746A 変異体に対しては全ての CD の阻害が弱くなり、特にβ-CD との阻害定数は 1000 倍近く低下することが明らかとなった。以上のことから、KPP に対する CD の相互作用には Phe746 が大きく関わっており、β-CD が一番強く阻害する原因が Phe746 にあることが明らかになった。

pullulanase, cyclodextrin, X-ray crystal analysis

講演番号：2A26p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A26 会場

希少糖 D-allose を基質とするイネ由来ヘキソキナーゼ 6 の X 線結晶解析

X-ray structure analysis of *Oryza sativa* hexokinase 6 which recognizes D-allose as substrate

○吉田 裕美[1,3]、松平 一志[2]、望月 進[3]、何森 健[2,3]、秋光 和也[2,3]、神鳥 成弘[1,3]([1]香川大・総合生命研究セ・医、[2]香川大・農、[3]香川大・国際希少糖研究教育)
○Hiromi YOSHIDA[1,3], Kazushi MATSUDAIRA[2], Susumu MOCHIZUKI[3], Ken IZUMORI[2,3], Kazuya AKIMITSU[2,3], Shigehiro KAMITORI[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center and Fac. Med, Kagawa Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ.)

【目的】ヘキソキナーゼは D-グルコースなどのヘキソースをリン酸化する酵素であり、多くのヘキソキナーゼは Mg と ATP を触媒反応に必要とし、D-グルコースから D－グルコース 6 リン酸を生成する。秋光らのグループは、イネ（*Oryza sativa*）にも複数のヘキソキナーゼが存在し、希少糖 D-アロースで処理したイネが、ヘキソキナーゼ依存的に植物のジベレリン経路抑制に関与して成長促成を受けること、ヘキソキナーゼ６（*Oryza sativa* Hexisokinase 6: OsHXK6）が希少糖 D-アロースを基質とすることを報告している。ジベレリンは植物の生長制御に関与する植物ホルモンの一種であり、D-アロースは D-グルコースの 3 位のエピマーで、希少糖の 1 つとして知られている。本研究では、D－グルコースだけではなく D-アロースも基質とするイネ由来ヘキソキナーゼ６（OsHXK6）の構造情報を得ることを目的に、X 線結晶解析を行った。
【方法】N 末端にチオレドキシン-ヒスチジンタグ（Trx-His-tag）を持つ OsHXK6 を大腸菌を宿主とした組換え体として発現し、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムを用いて精製後、ATP アナログの AMPPNP、Mg、D-グルコース存在下で共結晶化を行った。また、Trx-tag をプロテアーゼ処理により取り除いた ProOsHXK6 についても同様な条件で共結晶化を行った。それぞれ得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A にてデータ収集を行った。
【結果】D-グルコースが結合したシロイヌナズナ由来ヘキソキナーゼ（AtHXK1, PDBID:4QS7）の構造モデルを用いた分子置換法により、3.56Å分解能で AMPPNP, Mg, D-グルコースが結合した OsHXK6 の複合体構造を決定した。N 末端領域の Trx-tag の電子密度は確認できなかったが、OsHXK6 の全体構造は AtHXK1 と非常によく似ており、基質が結合した時の closed 構造を示した。また、OsHXK6 の分子間に特別な相互作用は見られないが、結晶中では弱いながらも三量体を形成しているような不安定な多量体構造を示した。N 末端領域の Trx-tag による多量体形成の影響が考えられたことから、Trx-tag を取り除いた ProOsHXK6/AMPPNP、Mg、D-グルコース複合体構造を 2.8Å分解能で決定したが、同様に不安定な三量体構造を示した。OsHXK6 は、条件下によっては、弱いながらも三量体を形成する可能性があると考えられる。

Hexokinase, Rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田裕美（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2A27a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A27 会場

酵母を用いたナリンゲニン 7-*O*-グルコシド *in vivo* 生産における内在性 β-グルコシダーゼ遺伝子破壊の効果

Improvement of naringenin7-*O*-glucoside production by the deletion of endogenous ß-glucosidases in *Schizosaccharomyces pombe*

○大橋 貴生、窪村 有紗、三﨑 亮、藤山 和仁（阪大生国セ）
○Takao OHASHI, Arisa KUBOMURA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

【背景】フラボノイドは主要な植物二次代謝産物の一つであり、単糖および糖鎖が付加した配糖体として存在している。これら糖鎖構造は多様であり、物性および生物学的特性に影響を与える。苦味配糖体であるナリンギンは柑橘類に豊富に存在し、糖鎖としてラムノース α1,2-グルコース構造を持ち、抗酸化活性や血流改善効果を示すことが知られている。以前、我々は分裂酵母を生体触媒とした *in vivo* ナリンギン生産を目指し、一糖目のグルコース転移に関わる糖転移酵素の発現株を用いて、ナリンゲニンを基質としたナリンゲニン 7-*O*-グルコシド（N7G）の *in vivo* 生産を報告した。しかし、本生産系では反応時間を伸ばすにつれて、生産物が分解される様子が観察され、分裂酵母内在性のβ-グルコシダーゼがこの分解に関連すると考えた。そこで、本研究では、分裂酵母β-グルコシダーゼ遺伝子破壊株を作成し、N7G の *in vivo* 生産における効果を調べた。
【方法】分裂酵母β-グルコシダーゼ遺伝子座に *ura4*+遺伝子を挿入し、遺伝子破壊株を作成した。β-グルコシダーゼ遺伝子破壊株にシロイヌナズナ由来ナリンゲニン-7-*O*-グルコース転移酵素（*AtGT2*）遺伝子を導入し、分裂酵母形質転換体を得た。形質転換体を用いた静止菌体法による N7G の *in vivo* 生産を行い、生成物の HPLC 解析を行った。
【結果と考察】逆相 HPLC 解析の結果、β-グルコシダーゼ遺伝子破壊株において、生成物の分解が抑制され、N7G 生産量の上昇が観察された。さらに、本破壊株にグルコシダーゼ阻害剤を添加したところ、相乗的に生成物分解を抑制できたことから、他にも分裂酵母内在性のβ-グルコシダーゼが N7G を分解することが示唆された。さらに内在性β-グルコシダーゼの多重遺伝子破壊株を構築することで、N7G のより効率的な *in vivo* 生産株の構築が可能となる。

flavonoids, glucosidase, glucosyltransferase

講演番号：2A27a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズイソフラボン生合成におけるメタボロン形成

Metabolon formation of isoflavone biosynthetic enzymes in soybean

○和氣 駿之、大豆田 亮、高橋 征司、中山 亨（東北大院工）
○Toshiyuki WAKI, Ryo MAMEDA, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【目的】ダイズ（*Glycine max*）などのマメ科植物は，5-ヒドロキシ型フラボノイド生合成経路とともに，5-デオキシ型フラボノイド生合成経路を有している．5-デオキシイソフラボノイドは，ファイトアレキシンの前駆体や根粒菌の誘因物質などとして植物－微生物間相互作用に重要な役割を果たしており，ダイズ（エンレイ品種）においては，根のフラボノイド総量の 90%以上が 5-デオキシ型である．この 5-デオキシ型と 5-ヒドロキシ型の生合成経路の分岐を担う鍵酵素はカルコン還元酵素（CHR）であり，CHR はカルコン合成酵素（CHS）との共反応により 5-デオキシフラボノイドの初発物質（デオキシカルコン）の生成を触媒する．ダイズの根では，この CHS と CHR の共反応が非常に効率的に起こっており，CHS から CHR への直接的な基質の受け渡し（基質チャネリング）が生じていることが想定されるが，その仕組みはまったく明らかになっていない．そこで本研究では，CHS から CHR への基質チャネリングに寄与する生体内メカニズムとして，タンパク質間相互作用による複合体（メタボロン）形成による代謝調節機構の存在を想定し，その実態の解明を目的とした．
【方法および結果】フラボノイド生合成におけるメタボロンは，膜タンパク質であるシトクロム P450 を足場として ER 膜上に形成されることが提唱されている．そこでまず，シトクロム P450 である 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素（IFS1 および IFS2）と相互作用する可溶性代謝酵素を，Split ubiquitin システムを用いる酵母ツーハイブリッドシステム（Y2H）により検索した．その結果，これら IFS と相互作用するタンパク質として，一つの CHS アイソザイム（CHS1）および一つの CHR アイソザイム（CHR5），3 つのカルコン異性化酵素（CHI）アイソザイム（CHI1A，CHI1B2，CHI4A）が同定された．さらに可溶性代謝酵素間の相互作用を，GAL4 システムを用いる核内 Y2H により解析したところ，CHS（CHS1 および CHS7）と CHI4A のみが相互作用することが示された．ここで，CHI4A は CHI 活性を持たないⅣ型 CHI フォールドファミリーに分類される機能未知のタンパク質である．CHS との相互作用の意義を解析するため，大腸菌異種発現酵素を用いて詳細な酵素機能解析を行ったところ，CHI4A は CHS の反応速度に影響し，k_{cat} 値を上昇させることが示された．本研究により，ダイズのイソフラボン代謝関連酵素間の相互作用ネットワークを明らかにし，CHS から CHR への基質チャネリングは IFS を介するメタボロン形成により達成されることが示唆された．また，CHI4A は CHS の活性を直接的に向上させることでメタボロン形成による代謝機能の高効率化に寄与することが示唆された．

isoflavone, metabolon, soybean

講演番号：2A27a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A27 会場

キンギョソウにおけるカルコン合成酵素の機能解析

Functional characterization of chalcone synthase in snapdragon

和氣 駿之、○寺下 美穂、中野 拓也、高橋 征司、中山 亨（東北大院工）
Toshiyuki WAKI, ○Miho TERASHITA, Takuya NAKANO, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【目的】キンギョソウ（*Antirrhinum majus*）は多彩な色調（白，赤，黄，オレンジ，マゼンタなど）の花弁を有する園芸作物である．花弁の黄色発色はフラボノイド化合物であるオーロンに起因しており，黄色花弁には aureusidin 6-glucoside と bracteatin 6-glucoside がおよそ 5：1（mol/mol）の割合で蓄積している．これらオーロンは，2’,4,4’,6’-テトラヒドロキシカルコン（THC）または 2’,3,4,4’,6’-ペンタヒドロキシカルコン（PHC）の 4’-*O*-グルコシド（THC4’G および PHC4’G）を前駆体として，オーロン合成酵素（AmAS1）の作用により液胞内で生合成される[1]．THC4’G を前駆体とする場合は aureusidin 6-glucoside のみが生成し，PHC4’G を前駆体とする場合は aureusidin 6-glucoside と bracteatin 6-glucoside がおよそ 5：1 の割合で生成される．また，AmAS1 は PHC4’G に対して最も高い活性を示す(THC4’G の 11 倍)ことが明らかになっている．これらのことから，キンギョソウ花弁におけるオーロン生合成の主な前駆体は PHC4’G であると推測されるが，PHC の生合成経路については未だ不明な点が存在する．本研究では，PHC 生合成経路を明らかにすることを目的として，カルコン合成酵素（CHS）に着目し，その詳細な酵素機能解析を行った．

【方法および結果】当研究室ではこれまでに，キンギョソウおよびキンギョソウと同じゴマノハグサ科のトレニア（*Torenia hybrida*）におけるフラボノイド代謝関連酵素群の相互作用解析を行い，フラボン合成酵素（FNS）を足場とする代謝酵素複合体（メタボロン）の存在を明らかにしてきた．このメタボロン形成から，CHS は Enhancer of Flavonoid Production（EFP）と相互作用することが示されている．また，ダイズにおいて CHS は CHI4A（EFP）の存在下で活性が上昇することが明らかになっている．そのため，CHS のアッセイでは EFP の有無を測定条件に加えて解析した．キンギョソウおよびトレニアの CHS，EFP を大腸菌発現ベクターpColdI に組み込み，大腸菌 BL21 株を用いて His_6-tag 融合タンパク質として発現させた．HisTrap カラムにより均一状態に精製し，CHS のスターター基質特異性の評価と速度論解析を行った．その結果，EFP の有無により CHS のスターター基質特異性に変化はなかったが，キンギョソウとトレニアの両方で EFP 存在下において CHS の k_{cat} 値の上昇が見られた．

【参考文献】[1] Nakayama, T. *et al.*, *Science* (2000) **290**, 1163-1166.

snapdragon, chalcone synthase, metabolone

講演番号：2A27a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A27 会場

陸上植物における EFP (enhancer of flavonoid production) の機能の普遍性

Enhancer of flavonoid production (EFP): its functional conservation in land plants

和氣 駿之[1]、○山田 彩友美[1]、大豆田 亮[1]、中野 拓也[1]、森田 裕将[2]、榊原 圭子[3]、星野 敦[4]、高橋 征司[1]、中山 亨[1] ([1]東北大院工、[2]名城大農、[3]理研 CSRS、[4]基生研)

Toshiyuki WAKI[1], ○ Sayumi YAMADA[1], Ryo MAMEDA[1], Takuya NAKANO[1], Yasumasa MORITA[2], Keiko YONEKURA-SAKAKIBARA[3], Atsushi HOSHINO[4], Seiji TAKAHASHI[1], Toru NAKAYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Meijo Univ., [3]RIKEN CSRS, [4]NIBB)

【背景および目的】近年，アントシアニン蓄積量の減少したアサガオの変異体から，フラボノイドの蓄積に関与する新しいタンパク質が同定され，Enhancer of Flavonoid Production（EFP）と命名された[1]．EFP は，フラボノイド生合成経路の上流酵素である Chalcone isomerase（CHI）と同様の全体構造をもつ IV 型 CHI フォールドファミリーに分類されるが，CHI 活性に必要な触媒残基を持たず，このタンパク質がどのようにフラボノイド生合成に関与しているかは解明されていない．

前の演者らが述べたように，ダイズ（*Glycine max*），キンギョソウ（*Antirrhinum majus*），トレニア（*Torenia hybrida*）において，EFP はシトクロム P450 およびフラボノイド生合成経路の初発酵素である Chalcone synthase（CHS）と相互作用することがわかった．さらに EFP の CHS との相互作用は CHS の k_{cat} を上昇させることも示された．IV 型 CHI フォールドタンパク質や CHS は陸上植物のゲノム中に広くコードされていることから，CHS との相互作用を介する EFP の機能が陸上植物において普遍的に保存されている可能性が考えられた．そこで本研究では，このことを確かめるために解析対象植物種をさらに拡大し，コケ植物 [ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)]，裸子植物 [イチョウ (*Ginkgo biloba*)]，単子葉植物 [イネ (*Oryza sativa*)]，および他の双子植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）について EFP と CHS の相互作用解析および大腸菌異種発現酵素を用いた酵素機能解析を行った．

【方法および結果】CHS と EFP 間の相互作用を Yeast two-hybrid 法，二分子蛍光補完法，免疫学的プルダウンアッセイ法によって解析した結果，調べたいずれの植物種においても CHS と EFP の相互作用が確認された．また大腸菌異種発現酵素を用いた速度論解析により，解析したすべての植物種において EFP の存在下で CHS の k_{cat} が増大することがわかった．フラボノイドは，陸上植物に普遍的に存在するフェニルプロパノイド経路からの分岐により生成することから，EFP はその分岐点に位置する CHS と相互作用することによりその活性を上昇させ，代謝フラックスを増強することによりフラボノイド蓄積量を高める役割を担うものと考えられ，この EFP の役割が陸上植物において高度に保存されていることが強く示唆された．

【参考文献】[1] Morita, Y. *et al.* , *Plant J.* (2014) **78**, 294–304

enhancer of flavonoid production, flavonoid, chalcone synthase

講演番号：2A27a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A27 会場

カンキツ類由来のフラボノイド-*C*-配糖化酵素の温度安定性の解析

Analysis of thermostability of flavonoid-*C*-glucosyltransferase from Citrus fruits

○山岸 由起子[1]、水藤 史明[2]、新井 亮一[1,3]、田口 悟朗[1,3] ([1]信州大院・総合理工、[2]東大院・新領域、[3]信州大・繊維)
○Yukiko YAMAGISHI[1], Fumiaki SUITO[2], Ryoichi ARAI[1,3], Goro TAGUCHI[1,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Font. Sci., Univ. of Tokyo, [3]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【研究背景】

フラボノイド–*C*–配糖化酵素(CGT)は、糖がフラボノイドの芳香環と炭素–炭素結合した *C*–配糖体を生合成する酵素である。この特殊な結合のため、フラボノイド–*C*–配糖体は加水分解を受けず、さらに様々な生理活性を示すことから、その合成酵素である CGT についてもその有効利用が期待されている。これまでに我々が単離同定した CGT の性質を調査したところ、キンカン由来の FcCGT は他の CGT より反応至適温度が 10℃程度高いことが明らかとなった[1)]。一般に、酵素は温度安定性が高いほど変性剤や有機溶媒に対しても安定性が高く、工業的利用においては望ましいことが多い。そこで本研究では、CGT の温度安定性を調査・比較することで FcCGT の至適温度が高い要因を解明することを目的とした。

【方法】

各 CGT を大腸菌で異種宿主発現させ、ニッケルアフィニティーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。これらについて、Differential Scanning Fluorometry (DSF)によりタンパク質の変性中点温度(Tm)を測定し、温度安定性の評価を行った。FcCGT と CuCGT の一次配列を比較して、相互に異なっておりかつ温度安定性に関与している可能性があると考えられた 7 つのアミノ酸残基についてそれぞれ点突然変異を導入した FcCGT を作出し、同様に温度安定性の評価を行った。

【結果及び考察】

各 CGT の温度安定性を調査したところ、キンカン由来の FcCGT の Tm は 59.5℃と他の供試した CGT と比べて 10℃程度高く、その安定性が特に高いことが明らかになった。FcCGT とアミノ酸配列同一性が 98%であるミカン由来の CuCGT は他の CGT と同様の Tm を示したことから、FcCGT 特異的にその安定性を向上させる配列要因があることが示唆された。CuCGT と異なるアミノ酸を点突然変異導入で変化させたそれぞれの FcCGT 変異体について DSF を行った結果、N297D、M332T、Q384H の 3 つの変異体では Tm 値が 2℃程度低下した。しかし、1 アミノ酸の変異導入では FcCGT の Tm を 10℃上昇させる要因となるアミノ酸残基を決定することはできなかった。そこで、これらの変異を組み合わせた FcCGT の多重変異体を作成した。現在その多重変異体の温度安定性の解析を行っており、その結果についても併せて報告したい。

[1)] Ito *et al.* (2017) *Plant J.* **92**, 185-197.

glucosyltransferase, thermostability, site mutagenesis

発表責任者：田口悟朗（gtagtag@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A27a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A27 会場

シロイヌナズナのフェノール性異物の配糖化には複数の配糖化酵素が関与する

Multiple glucosyltransferases contribute to the phenolic-xenobiotics glucosylation in *Arabidopsis thaliana*

○八尾 惟[1]、下坂 誠[1,2]、田口 悟朗[1,2] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大繊維)
○Yui YAO[1], Makoto SHIMOSAKA[1,2], Goro TAGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【研究背景】　植物は農薬などのフェノール性異物にさらされると、配糖化などの修飾をしたのちに液胞に蓄積する異物代謝経路を持っている。フェノール性異物である 2-ナフトール(2-NA)をシロイヌナズナに投与すると、根から受動拡散的に吸収された異物は配糖化酵素によりグルコース配糖化された配糖体(2−NAG)となったのち、さらにマロニル化酵素 PMaT1 によってマロニル化を受けたマロニルグルコシド(2-NAGM)となって液胞に輸送・蓄積される。一方、2-NAG の一部は培地中に放出されることが分かっている[1)]。これまでに、配糖化酵素 UGT72B1 がこの異物代謝に関与することが示唆されているが、まだ未解明な点が多い。本研究では、これらのシロイヌナズナにおけるフェノール性異物の細胞内代謝機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

【実験方法】　シロイヌナズナの UGT72B1 および PMaT1 の各種遺伝子破壊株ホモ接合体に加え、両遺伝子破壊株を作出してその幼植物に 2-NA を投与し、培地および細胞内に蓄積された代謝物を HPLC で解析した。また、幼植物の根で特異的に発現する配糖化酵素から候補遺伝子を選定し、大腸菌により異種宿主発現させた。精製した酵素を 2-NA を基質として反応させて生成物を HPLC で解析して活性を確認し、候補遺伝子の絞り込みを行った。

【結果・考察】　シロイヌナズナ変異株に 2-NA を投与したところ、*ugt72b1* 破壊株では 2-NAG がほとんど培地中に放出されず、植物中には野生株と同様に 2-NAGM が蓄積したのに対し、*pmat1* 破壊株では 2-NAG の培地中への放出量が増加し、植物中には 2-NAGM がほとんど蓄積しなかった。さらに、*ugt72b1*, *pmat1* の二重破壊株では野生株と比較してわずかに 2-NAG が放出されたが、植物体内には 2-NAGM が蓄積しなかった。以上から、2-NAGM の生成に関わる代謝には UGT72B1 とは異なる配糖化酵素が関与していることが示唆された。そこで、この代謝に関わる酵素遺伝子を探索するため 12 種の配糖化酵素遺伝子を候補として選抜し、大腸菌で異種宿主発現させた酵素を用いて 2-NA に対する配糖化活性を調査した。その結果、そのうち 5 種が 2-NA に対する配糖化活性を有していた。現在、これらの遺伝子についてシロイヌナズナの変異株を入手して 2-NA 代謝との関連性を調査しており、その結果についても併せて報告したい。

[1)] Taguchi *et al*. (2010) *Plant J*. **63**, 1031-1041

xenobiotics, glucosyltransferase, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：田口悟朗（gtagtag@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A27a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズ根から分泌されるイソフラボンの根圏での動態解析とモデル化
Dynamics analysis and modeling of isoflavones secreed from soybean roots in the rhizosphere
○奥谷 芙季[1]、山崎 由実[1]、濱本 昌一郎[2]、二瓶 直登[2]、西村 拓[2]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京大・生存研、[2]東京大・院農生命科)
○ Fuki OKUTANI[1], Yumi YAMAZAKI[1], Shoichiro HAMAMOTO[2], Naoto NIHEI[2], Taku NISHIMURA[2], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Agricultural and Life Sciences, Univ Tokyo.)

ダイズは根から糖やアミノ酸等、イソフラボン等の二次代謝産物を分泌する。これらの分泌物は土壌中の微生物の栄養源となり、根圏は土壌中の他の領域に比べ微生物活性が高くなる要因となる。さらに、分泌されたイソフラボンは、土壌中で根粒菌との共生シグナルや、抗菌性ファイトアレキシンとして機能する他、根圏微生物叢の制御にも関与すると報告されている。このように根圏の形成と維持に植物の分泌物が需要な役割を担うと考えられているが、根圏での植物代謝物の動態は未解明な部分が多く、根からの影響を受ける領域である根圏を明確に捉えることは困難であった。そこで本研究では、ダイズ根圏域の定義を目的として、ダイズ圃場において根圏のイソフラボンを解析するとともに、根圏土壌でのイソフラボン動態モデルを検討した。

水耕栽培においてダイズ根からのイソフラボン分泌は、栄養成長期に高く、主にダイゼインが分泌され、生殖成長期には分泌量が減少し配糖体の割合が高まることを報告した（日本農芸化学会 2015 年大会)。圃場においては、栄養成長期、生殖成長期ともにイソフラボン含量はバルク土壌よりも根圏土壌で高かったが、生殖成長期には減少しなかった。ダイゼイン及びその配糖体の分解速度を基にしたシミュレーションにより、圃場においてもダイゼイン分泌量は栄養成長期に高く、生殖成長期に減少することが示唆された。さらに、ダイゼインの土壌への分配係数を求め、これらのパラメータを用いて土壌中でのダイゼイン動態をシミュレーションしたところ、ダイズ根表面から分泌されたダイゼインの移動距離は 7 日間で 1 ㎜、70 日間で 2-3 ㎜程度であることが示された。シミュレーション結果を検証するために、根箱を用いてダイズを栽培し、根分泌ダイゼインの移動距離を測定した。その結果、ダイゼインの移動は根から 2 ㎜程度とシミュレーションと同等であり、用いた移動モデルの妥当性が確認された。ダイゼインの土壌中における吸着特性を解明するために、異なる pH 条件で吸着実験を行った。結果、pH が上昇するに従い、ダイゼインの吸着量が減少した。これはアルカリ条件下では、pH 依存荷電を有する粘土鉱物端面や腐植物質での負電荷量が増したことにより、同じく負電荷を有するダイゼインの土壌への吸着が阻害されたためだと考えられる。さらに有機物を分解した土壌試料を用いて同じく吸着実験を行ったところ、ダイゼインの吸着量が減少した。よって、ダイゼインが有機物に吸着していること、また腐植物質のもつ pH 依存性荷電がダイゼインの動態に影響を与えることが示唆された。現在、微生物叢解析によりダイゼインの影響する範囲の解析を行っている。

rhizosphere, isoflavone, *Glycine max*

講演番号：2A27a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズ根から分泌されるサポニンの解析
Soyasaponins, a new class of root exudates in soybean
○津野 雄平[1]、藤松 輝久[1]、遠藤 圭二[1]、杉山 暁史[2]、矢崎 一史[2] ([1]花王(株)・生物科学研、[2]京都大学・生存研)
○ Yuhei TSUNO[1], Teruhisa FUJIMATSU[1], Keiji ENDO[1], Akifumi SUGIYAMA[2], Kazufumi YAZAKI[2] ([1]Kao Corp., [2]Kyoto Univ.)

植物の根から分泌される代謝物は、根分泌物と総称される。根分泌物は根圏において、土壌微生物へのシグナル、病害虫に対する防御、無機栄養の吸収等の様々な現象に関与することが知られている。しかしながら、個々の植物における根分泌物の化学的な多様性、さらにその土壌中動態を含めた全体像については未だ十分に解明されていない。我々は、作物として重要性が高く、かつ根粒菌との共生といった根圏で特徴的な生態を有するダイズに着目し、根分泌物の詳細な解析を行った。ダイズでは、根粒菌との共生を開始するシグナルとして、イソフラボン類が根から分泌されることが知られているため、これを指標としてダイズ幼植物の水耕養液を LC-MS で網羅的に分析した。

その結果、トータルイオンクロマトグラムにおいて、保持時間約 8 min に比較的大きなピークが観測された。このピークは、ダイゼイン（保持時間 6.2 min）やゲニステイン（保持時間 7.0 min）等でみられるような、イソフラボンを特徴付ける 254 nm の UV 吸収極大を示さなかった。TOFMS スペクトル解析における精密質量数および同位体組成比から、この保持時間 8 min のピークは、分子式 $C_{48}H_{78}O_{18}$ に相当する化合物であると推定された。また、この化合物の MS/MS スペクトルは特徴的な開裂パターンを示し、$C_{30}H_{50}O_3$ のアグリコンと 3 分子の糖から成ることが推測された。以上の結果に加え標品を用いた分析結果から、ダイズの根分泌物中のこの代謝産物は、ソヤサポニン Bb（ソヤサポニン I）であると同定した。

そこで、ダイズの出芽から結実に至るまでの各生育過程において、ソヤサポニン Bb を含む各種ソヤサポニン類（グループ A、グループ B、グループ E、DDMP サポニンおよび各々のサポゲニン類）の分泌の挙動を調査し、その量および組成について組織中との比較を行った。またここでは、イソフラボン類の分泌挙動を比較対象とした。さらに、ソヤサポニン類はマメ科植物に広く存在することが知られていることから、ダイズ以外のマメ科植物（ミヤコグサ、ムラサキウマゴヤシおよびエンドウ）についても水耕養液中のソヤサポニンの分析を実施した。本発表では、ダイズ根からのソヤサポニン分泌の特性に加え、ダイズを含むマメ科植物の根からのソヤサポニン類の分泌に関して、生育過程依存性、種特異性およびそれぞれの組織中の組成との差異に係る新たな知見について報告する。

root exudate, soyasaponin, *Glycine max*

講演番号：2A27a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A27 会場

ヤセウツボのα-ガラクトシダーゼ阻害剤が発芽に与える影響
Effect of α-galactosidase inhibitors on germination of *Orobanche minor*
○馬場 敦也[1]、小川 拓水[1]、杉本 幸裕[2,3]、太田 大策[1]、岡澤 敦司[1,3] ([1]阪府大院生命、[2]神大院農、[3]JST/JICA・SATREPS)
○ Atsuya BABA[1], Takumi OGAWA[1], Yukihiro SUGIMOTO[2,3], Daisaku OHTA[1], Atsushi OKAZAWA[1,3] ([1]Osaka Pref Univ., [2]Kobe Univ., [3]JST/JICA・SATREPS)

寄生植物は宿主となる植物から養水分を吸収することで成長する植物である。ハマウツボ科の根寄生雑草はアフリカを中心として農業に甚大な被害を与えている。種子は 0.2 mm と極微小で数十万粒産生されるため，一度感染した土地から完全に除去することは困難である。寄生の確立後は宿主植物と結合しているので，寄生雑草を選択的に枯死させることは難しい。そこで，我々は根寄生雑草の発芽過程に着目した。ハマウツボ科のヤセウツボ（*Orobanche minor*）の発芽時にプランテオースというガラクトースとスクロースからなる三糖が減少することを確認した。さらに，プランテオースの代謝が発芽に重要であることを明らかにした。一方，プランテオースは宿主植物の成長に必要ではない。そこで，本研究ではプランテオースの代謝に関わる酵素を同定し，その阻害剤がヤセウツボ種子の発芽に与える影響を調べた。まず，ヤセウツボ種子発芽時のトランスクリプトームデータから，プランテオースを加水分解していると考えられる α-ガラクトシダーゼ（OmAGAL）遺伝子を取得した。この配列のシグナル配列を除き，N 末端に GST タグを融合させた GST-⊿TP-OmAGAL を大腸菌で発現させたところ，α-ガラクトシダーゼ活性を持ち，酸性条件下においてその活性が高くなることがわかった。さらに，ヤセウツボから単離したプランテオースも同様に酸性条件下において加水分解することが確認できた。また，OmAGAL 阻害剤を約 15,000 からなる化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行ったところ，25 化合物にその阻害活性を確認できた。OmAGAL 阻害剤をヤセウツボ種子に処理すると，幼根の伸長が阻害された。現在，OmAGAL 阻害剤がヤセウツボ種子中でのプランテオース代謝を阻害しているのかを調べている。

planteose, alpha-galactosidase, parasitic plant

発表責任者：岡澤敦司（okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A27a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A27 会場

ゼニゴケのアントシアン輸送能の生化学的解析
Biochemical analysis of anthocyan transport in *Marchantia polymorpha*
○有坂 亮汰[1]、井上 健太郎[1]、渡辺 文太[2]、久保 浩義[1]、高梨 功次郎[1,3] ([1]信州大・理、[2]京大・化研、[3]信州大・山岳研)
○ Ryota ARISAKA[1], Kentaro INOUE[1], Bunta WATANABE[2], Hiroyoshi KUBO[1], Kojiro TAKANASHI[1,3] ([1]Fac. Sci. Shinshu Univ., [2]ICR, Kyoto Univ., [3]IMS, Shinshu Univ.)

【目的】フラボノイドの一種であるアントシアンは植物で普遍的にみられる二次代謝産物である。植物中で UV 吸収や抗菌作用などの生理機能を有する他、ヒトの体内で抗酸化作用が見込まれており、健康食品への利用等も積極的に行われている。アントシアンは植物細胞の細胞質で生合成された後、その強い生理活性が植物自身に影響を与えることを避けるため、高等植物では主に液胞に、コケ植物ではアポプラストにそれぞれ輸送される。高等植物においてアントシアンは ABC タンパク質や MATE 輸送体、小胞輸送等によって液胞に輸送されることが報告されている。その一方で、コケ植物のアントシアン輸送機構の解析例は無い。アントシアンを細胞外に排出する機構を明らかにし、高等植物に応用することが出来れば、細胞からの抽出過程を経ずにアントシアンの回収が可能となる。そこで本研究では、コケ植物のアントシアン輸送機構を解明することを目的とした。
【材料と方法】コケ植物タイ類のモデルとして広く研究されているゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)の Tak1 株を研究材料として用いた。ゼニゴケは Riccionidin A というアントシアニジンをアポプラストに蓄積する。ゼニゴケから膜画分を抽出し膜 vesicle を調製して、スピンカラムを用いた Riccionidin A の輸送活性測定を行った。
【結果と今後の展望】ATP 添加条件で、非添加条件と比較して有意に Riccionidin A が膜 vesicle に取り込まれていることが明らかになった。この結果は、ゼニゴケが ATP 依存的なアントシアン輸送機構を有していることを示唆する。高等植物では ATP 依存的アントシアン輸送機構として ABC タンパク質と MATE 輸送体が機能していることが報告されている。今後、これら輸送体の阻害実験を行い、ゼニゴケの ATP 依存的輸送機構を詳細に検証する予定である。

plant, *Marchantia polymorpha*, anthocyan

講演番号：2A27a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズ由来 Glycoside hydrolase family 1 β-グルコシダーゼの網羅的な機能解析

Comprehensive characterization of Glycoside hydrolase family 1 ß-glucosidases from soybean [Glycine max (L.) Merr]

○山田 えりか、和氣 駿之、高橋 征司、中山 亨（東北大院工）
○Erika YAMADA, Toshiyuki WAKI, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【目的】イソフラボンはダイズ [*Glycine max* (L.) Merr.] などマメ科植物に多く含まれるフラボノイド化合物であり，ダイズにおいて根粒菌の誘因物質やファイトアレキシンの前駆体として機能する．ダイズ細胞内に含まれるイソフラボンの多くは，配糖体化・アシル化された修飾型イソフラボンとして貯蔵されている．しかし，イソフラボンの生理機能はアグリコン型で発揮されることから，イソフラボンの修飾・脱修飾の段階はイソフラボンが関わるダイズの生理応答を理解する上で非常に重要である．当研究室ではこれまでに，修飾型イソフラボンの脱修飾を触媒する Glycoside Hydrolase family 1 (GH1) β-グルコシダーゼ (GmICHG) を同定している[1]. GmICHG は根の細胞外に局在することから，細胞外へ分泌される修飾型イソフラボンをアグリコンへ変換する役割を持つことが示唆された．しかし，ダイズの懸濁培養細胞におけるエリシター応答の解析からは，細胞内で生じる修飾型イソフラボンの減少に対する GmICHG の寄与は見いだされなかった．本研究では，エリシター処理に応答した修飾型イソフラボンの分解代謝に GmICHG 以外の β-グルコシダーゼ (BGLU) の寄与を想定し，ダイズ GH1 に属する BGLU の網羅的な機能解析を行った．

【方法および結果】ダイズ懸濁培養細胞にエリシターとして酵母抽出液を添加し，1，2，5，10，24 h 後にサンプリングを行い，粗酵素溶液の調製と RNA 抽出を行った．調製した粗酵素溶液を用いて修飾型イソフラボンに対する BGLU 活性を測定した結果，イソフラボン配糖体に対する BGLU 活性がエリシター処理により一過的に増加することが示された．次に，ダイズ GH1 の BGLU に着目し，その発現変動をリアルタイム PCR により解析した．その結果，エリシター処理により一過的に発現誘導される BGLU サブグループの存在が明らかになり，これら BGLU の粗酵素活性への寄与が示唆された．続いて大腸菌異種発現 BGLU を用いて複数のフラボノイド配糖体に対する活性測定を行った結果，エリシター処理で発現量が増加した BGLU はイソフラボン配糖体に対する基質特異性が高いことが示された．また，ベンサミアナタバコの表皮細胞に蛍光タンパク質を融合させた BGLU を一過的に発現させ局在解析を行ったところ，BGLU は細胞質もしくは細胞外に局在することが示唆された．以上から，エリシター応答で一過的に発現量が増加するイソフラボン配糖体特異的 BGLU が細胞内のイソフラボン配糖体の分解代謝に寄与することが示唆された．

【参考文献】[1] Suzuki H *et al*., *J. Biol. Chem*. **281**, 30251-30259 (2006)

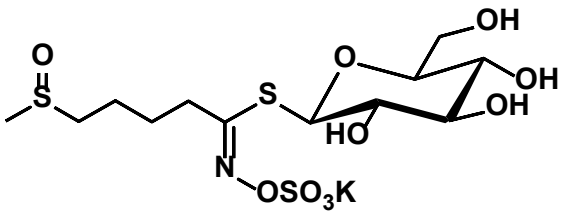
isoflavone, soybean, ß-glucosidase

講演番号：2A27a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A27 会場

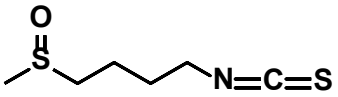
ブロッコリスプラウト中の機能性成分の増強に関する研究
Study on the Enhancement of Functional Components in Broccoli Sprout
○中西 健太[1]、平井 晶子[3]、中田 光彦[3]、柳瀬 笑子[1,2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生、[3]（株）サラダコスモ)
○Kenta NAKANISHI[1], Akiko HIRAI[3], Mitsuhiko NAKADA[3], Emiko YANASE[1,2] ([1]Graduate Scool of Natural Science and Technology, Gifu Univ., [2]Gifu Univ., [3]SALAD COSMO CO.,LTD)

【背景】ブロッコリースプラウト中にはグルコシノレート(GSL)の一種であるグルコラファニン(glucoraphanin, **1**)が多く含まれており、**1** は植物体内のミロシナーゼにより加水分解されることによって、イソチオシアネート（ITC）の一種であるスルフォラファン(sulforaphane, **2**)に変化する。近年、**2** は抗ガン作用や抗酸化活性、抗菌性などの健康に関する機能性が数多く報告されていることから注目されている。こういった二次代謝物は成熟した植物体よりも若い新芽(スプラウト)の段階で高濃度に含まれていることが知られており、スプラウトは発芽から収穫までの日数が短く低コストであることから、食生活を手軽に改善し健康増進を図る効果が期待される。本研究では、スプラウト中の GSL 類の高含量化を目指し、発芽に伴う 1 の経時的変化、種子の産地・ロットの違いによる 1 の含有量に与える影響について調査した。さらに、生育環境中の化学物質（エリシター）による含有量への影響について明らかにすることにした。
【方法･結果】産地やロットの異なる種子を用い、水に浸漬後、播種し 25℃にて栽培した。2-7 日目で収穫後、凍結乾燥、粉砕、抽出を経て HPLC による検量線法で **1** の定量を行った。HPLC 分析の結果、主要成分として **1** が含まれる他、炭素数が異なる類縁化合物も観察された。種子中の **1** は産地・ロットの違いにより 0～20 mg/g D.W. 程度のものまで様々であった。種子中の **1** の差は発芽後でも大きく影響し、特に種子中に痕跡程度しか含まれないものは生長後もほとんど **1** を生産しないことが明らかとなった。次に、生育環境中のエリシター添加による **1** の含有量への影響について検討した。エリシターとして、当研究室で大豆もやし中のイソフラボン量の増加で効果の見られた酵母細胞壁の他、酵母細胞壁構成糖類、植物ホルモン、**1** の生合成中間体であるアミノ酸等を用いた。その結果、**1** の生産量の増加傾向が見られる添加物も観察されたが、産地・ロットによる挙動の差が大きく優位な差は見られなかった。

現在、ブロッコリースプラウト中のグルコシノレート類の一種であるグルコブラシシンの生産量への影響を調査しており合わせて報告する。



Glucoraphanin, **1**



Sulforaphane, **2**

Glucosinolate, Isothiocyanate, Elisitor

発表責任者：柳瀬　笑子（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A27a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A27 会場

チューリップにおけるチューリッポシド B 変換酵素の分子多様性：葉由来アイソザイムの同定
Molecular diversity of tuliposide B-converting enzyme in tulip: Identification of the isozyme from leaves

○野村 泰治[1,2]、口田 亮[2]、酒本 千穂[2]、北岡 直樹[1,2]、加藤 康夫[1,2]（[1]富山県大・生工研セ、[2]富山県大工・生物工）
○Taiji NOMURA[1,2], Ryo KUCHIDA[2], Chiho SAKEMOTO[2], Naoki KITAOKA[1,2], Yasuo KATO[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中に著量含まれるグルコースエステル、チューリッポシド（Pos）類（6-PosA、6-PosB）はチューリップの主要二次代謝産物であり、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素（tuliposide A-converting enzyme; TCEA）および PosB 変換酵素（TCEB）によって、抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体、チューリッパリン（Pa）A および PaB へとそれぞれ変換される。TCEA および TCEB は、分子内エステル転移によるラクトン形成反応を触媒するユニークなカルボキシルエステラーゼファミリー酵素である。これまで、TCEA と TCEB のいずれにも複数のアイソザイムが存在し、アイソザイムによって主たる発現組織が異なることが明らかになっている。そのうち TCEB については、花粉と根から酵素遺伝子（花粉由来；*TgTCEB1*、根由来；*TgTCEB-R*）が同定されているが、いずれも由来組織特異的に発現しており、葉のように粗酵素中で有意な TCEB 活性が検出される他組織における発現がみられなかったことから、さらに別の TCEB アイソザイムが存在することが強く示唆された。本研究では、葉からの TCEB の精製、酵素遺伝子の同定およびその機能解析を行い、チューリップにおける TCEB の分子多様性を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】チューリップ品種「紫水晶」を土耕栽培し、葉の生育過程における TCEB 活性の経時分析を行ったところ、生育初期の葉で特に高い酵素活性が検出された。同時期の葉 100 g から抽出した粗酵素から、硫安分画および 5 段階のカラムクロマトグラフィーを経ることで、TCEB を精製倍率 197 倍で均一に精製した。本酵素は、先に精製された花粉および根由来 TCEB と同様にホモ二量体酵素であったが、サブユニット分子質量はそれらとは明らかに異なっていた。本酵素の反応効率（V_{max}/K_m）は 6-PosA よりも 6-PosB に対して約 200 倍高く、本酵素が 6-PosB をよい基質とすることが確認された。部分アミノ酸配列解析の後、定法にしたがって葉 mRNA から当該酵素遺伝子 cDNA（*TgTCEB-L*, L; leaf）を新たに単離した。TgTCEB-L の一次配列は、花粉および根由来 TgTCEB と約 75%の identity を有し、それらと同様にカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが確認された。また、大腸菌で発現させた TgTCEB-L 組換え酵素は、天然型酵素と同様に二量体として発現し、反応速度パラメーターも、天然型酵素のものと概ね一致した。*TgTCEB-L* 遺伝子特異的な定量 RT-PCR によって、各組織における転写レベルを調べたところ、本遺伝子は、花粉や根で組織特異的に発現している *TgTCEB1* や *TgTCEB-R* とは異なり、葉を含む複数の組織で発現していることが分かった。以上の結果、組織ごとの TCEB アイソザイムの使い分けが酵素、遺伝子の両面から明らかとなった。

tulipalin, tuliposide, tuliposide-converting enzyme

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

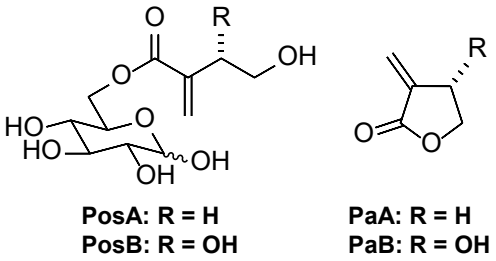
講演番号：2A27a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A27 会場

チューリッポシド変換酵素の基質特異性の検討: 基質アルコール部位の影響

Substrate specificity of tuliposide-converting enzyme: Effect of alcohol unit

○二永 貴[1]、野村 泰治[2]、北岡 直樹[2]、加藤 康夫[2] ([1]富山県大院・工、[2]富山県大・生工研セ)
○Takashi FUTANAGA[1], Taiji NOMURA[2], Naoki KITAOKA[2], Yasuo KATO[2] ([1]Grad. School Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

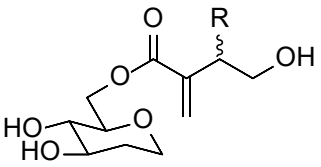
【目的】チューリップ組織中に著量含まれるグルコースエステル、チューリッポシド (Pos) 類 (PosA、PosB) はチューリップの主要二次代謝産物であり、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素 (tuliposide A-converting enzyme; TCEA) および PosB 変換酵素 (TCEB) によって、抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体、チューリッパリン (Pa) A および PaB へとそれぞれ変換される。TCE はカルボキシルエステラーゼファミリーに属するが、Pos 類の加水分解反応ではなく、分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークな酵素である。その反応機構は、Pos 類と TCE がアシル酵素複合体を形成した後、水分子ではなく基質末端の水酸基の活性化と分子内求核反応を経ることで、Pa 類のラクトン構造を形成すると推定されている[1)]。しかしながら、TCE が基質 Pos 類のどの部分を主に認識して活性中心に取り込み、Pa 類へと変換するのか明らかになっていない。そこで本研究では、Pos 類エステル部分のアルコールの構造を改変した基質を用いて、本酵素の基質認識がどのように行われているのか解明することを目的とした。



PosA: R = H
PosB: R = OH

PaA: R = H
PaB: R = OH

【方法と結果】PosA、PosB のアシル側鎖部分は、それぞれ 1,4-butanediol から 4 段階、solketal から 6 段階で合成した。Pos 類エステル部分をメチルエステルや SNAC 型チオエステルにしたものに加えて、グルコースを模倣したシクロヘキシルメチル-、テトラヒドロピラニルメチル-、1,2,3-トリデオキシグルコース-、および 1,2-ジデオキシグルコースエステルとした計 12 種の基質類縁体へと、それぞれ対応するアルコールまたはチオールとの縮合および脱保護により誘導した。これらを基質として、大腸菌で発現させた組換え TCE (TgTCEA1、TgTCEB1) を用いて酵素活性を測定した。その結果、本来の基質である Pos 類と比較して、メチルエステル型や SNAC 型をはじめとする 10 種の基質類縁体に対する活性値は 1/100-1/10 程度であったのに対し、1,2-ジデオキシグルコース型基質に対する活性値は、TCEA では PosA と同程度、TCEB では PosB の 1/5 であり、他の基質類縁体と比べて良好な基質として認識された。このことから、TCE の基質認識にはエステル部位の六員環構造および水酸基の位置や数が重要であることが示唆された。



1,2-Dideoxy PosA: R = H
1,2-Dideoxy PosB: R = OH

1) T. Nomura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2017**, 81, 81-94.

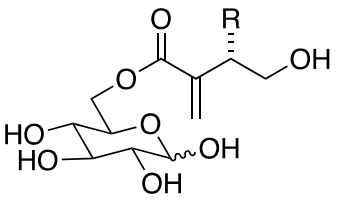
lactone-forming carboxylesterase, tulipalin, tuliposide

講演番号：2A27a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A27 会場

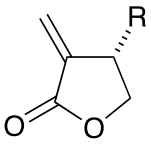
チューリッポシド/チューリッパリン類の抗細菌活性の再評価
Re-evaluation of an antibacterial activity of tuliposides and tulipalins

○加藤 康夫[1,2]、中川 恵蔵[2]、近堂 菜月[2]、北岡 直樹[1,2]、野村 泰治[1,2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]富山県大工・生物工)
○Yasuo KATO[1,2], Keizo NAKAGAWA[2], Natsuki KONDO[2], Naoki KITAOKA[1,2], Taiji NOMURA[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中には糖エステルであるチューリッポシド (Pos) 類 (PosA、B) が二次代謝産物として著量蓄積している。一方で、Pos 類のアグリコンのラクトン化体であるチューリッパリン (Pa) 類 (PaA、B) も微量ながら存在している。チューリップ組織中において、Pos 類は生理活性を示す Pa 類の貯蔵物質、すなわち前駆体であり、この Pos 類から Pa 類への変換反応は新規カルボキシルエステラーゼである Pos 変換酵素によって触媒されることが当研究室のこれまでの研究によって明らかにされている。PaA は抗真菌活性、PaB は抗細菌活性を主に示すとされているがその活性は低く、IC_{50} 値で百μM～mM オーダーである。今回、Pos/Pa 類の抗細菌活性を再度精査し、評価したので報告する。



R = H; PosA, OH; PosB



R = H; PaA, OH; PaB

【方法及び結果】抗細菌活性の測定は、被検菌として枯草菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌を用い、比濁法 (ISO 20776-1 に準拠：Mueller-Hinton (MH) 培地、18 hr 培養) にて行った。菌種によって多少差があるものの、PosA は全ての細菌に生育阻害効果がなかったのに対し、PaA は百μM～mM、PosB、PaB は十～百μM オーダーの IC_{50} 値で抗菌活性を示した。抗菌活性測定中における Pos/Pa 類の分解の有無をみるため、培養後の培地中の Pos/Pa を HPLC にて定量したところ、PosA、PaA ともに一部が分解されており、PosB、PaB にいたってはほとんど残存していなかった。MH 培地中での Pos/Pa 類の安定性を詳細に追跡したところ、PosA、PaA は 18 hr 以上安定であったのに対し、PosB、PaB は化学的に極めて不安定であり (半減期：～4 hr)、MH 培地を用いるこれまでの方法では正しい抗菌活性が求められていない可能性が出てきた。MH 培地に含まれる肉汁やカゼイン分解物に由来するペプチド成分が PosB、PaB の安定性に影響を及ぼすと推測し、菌の生育能の維持とペプチド成分の混入を極力抑えた、M9 培地に酵母エキスを 0.2%とビタミン混液を添加した改変 M9 培地 (mM9-0.2 培地) を設定した。mM9-0.2 培地中での Pos/Pa 類の安定性を確認したところ、MH 培地と比べて PosB、PaB の安定性が顕著に向上していた。同培地を用いて再度比濁法にて抗細菌活性測定を行い先の結果と比較したところ、PosA、PaA の IC_{50} 値はほぼ変化がなかったのに対し、PosB、PaB ともに大きく抗細菌活性が向上し、特に PaB は kanamycin と同等の数～数十μM の IC_{50} 値を示すことが分かった。

tuliposide, tulipalin, antimicrobial activity

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2A27p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A27 会場

薬用植物ムラサキのシュートを用いた VIGS アッセイ系の確立に向けて

Applicability of VIGS to shikonin production in *Lithospermum etythrorhizon*

○井坂 夏海[1]、草野 博彰[1]、増田 税[2]、下村 講一郎[3]、矢崎 一史[1] ([1]京大・生存研、[2]北大院・農、[3]東洋大院・生命科学)
○Natsumi ISAKA[1], Hiroaki KUSANO[1], Chikara MASUTA[2], Koichiro SHIMOMURA[3], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Graduate Sch. of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Department of Life Sci., Toyo Univ.)

ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) はムラサキ科の多年生草本で、古くから薬用植物として利用されてきた。その薬効本体であるシコニン誘導体は、根で生産され、抗菌作用、止血作用、抗炎症等、様々な生理活性をもつ赤紫色の脂溶性化合物である。我々は、シコニンの生合成および蓄積・分泌のメカニズムを明らかにすることを目指している。これまでに、シコニン生合成の研究は主に培養細胞を用いて行われ、生合成酵素が同定され、遺伝子の単離などの報告がなされてきた。しかし、生合成後半の重要な数ステップが未解明の状態である。また、輸送・蓄積もどのようなマシナリーにより、どのようなプロセスを経て細胞外へ分泌されるのか、そのメカニズムはほとんど解明されていない。複数のオミクス解析により、シコニン生合成酵素として 6 個、輸送・蓄積酵素として 16 個の候補遺伝子がリストアップされ、単離と機能解析が行われているが、ムラサキでは形質転換系が確立されておらず、それらの因子の評価が困難であるため、形質転換による評価の系の確立が急務である。

本研究では、その課題を解決するべく、候補遺伝子の解析手法として virus-induced gene silencing (VIGS) に着目した。この手法のメリットは、形質転換が困難な実用植物種に対しても遺伝子導入が可能な点にあり、実用植物の遺伝子機能研究には適していると考えられている。一方で、ウイルス種と植物の組み合わせに制限があり、感染が成立しないと遺伝子導入ができない。ムラサキに関しては、キュウリモザイクウイルス (CMV) を感染させ、感染個体から RNA を抽出し、RT-PCR で CMV の RNA の検出することで感染が成立することを確認した。また本研究では、大量生産が可能なことや無菌の系である利点を考慮し、ムラサキのシュートを実験系に用いることとした。ムラサキシュートにおける VIGS の評価が可能であることを確認するために、シコニン生産培地である M9 培地で培養し、シコニン生産量の経時的に定量し、変化の確認を行った。以上を踏まえて、CMV を介した VIGS を用いて、シコニン生産（生合成および分泌）に関わると予測される遺伝子に対してサイレンシングを行うための実験系の構築を目指す。現在、アッセイ系の確立の確認として、既知の生合成遺伝子のサイレンシングによりシコニン生産への影響を確認しており、その結果もあわせて報告する。

vigs, Lithospermum erythrorhizon, shikonin

講演番号：2A27p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A27 会場

ムラサキのシコニン生成時に発現する Short-chain dehydrogenase/reductase の機能解析
Characterization of short-chain dehydrogenase/reductase responsive to shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*

○吉岡 奈津子[1]、渡辺 文太[2]、矢崎 一史[3]、高梨 功次郎[1,4]([1]信州大・理、[2]京大・化研、[3]京大・生存研、[4]信州大・山岳研)
○Natsuko YOSHIOKA[1], Bunta WATANABE[2], Kazufumi YAZAKI[3], Kojiro TAKANASHI[1,4] ([1]Fac. Sci. Shinshu Univ., [2]ICR, Kyoto Univ., [3]RISH, Kyoto Univ., [4]IMS, Shinshu Univ.)

〈目的〉

薬用植物のムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）の根で生産されるシコニンは鮮やかな紫色を呈し、抗菌作用や抗炎症作用を有する。そのため、ムラサキの根は昔から生薬の紫根として利用されてきた。ムラサキは培養細胞系が確立されており、本細胞系を用いてシコニンの生合成経路に関する研究が盛んに行われている。しかしながら、シコニン生合成経路の完全な解明は未だ行われていない。ムラサキの培養細胞系にはシコニン生成促進条件と生成抑制条件が存在する。それぞれの条件の培養細胞で発現しているタンパク質の比較プロテオーム解析を行ったところ、シコニン生成時特異的に発現する Short-chain dehydrogenase / reductase が一分子種（LeSDR1）見いだされた。本研究では LeSDR1 の機能解析を行い、LeSDR1 のシコニン生合成経路への関与の有無を調べることを目的とした。

〈方法と結果〉

His-Tag を付加した LeSDR1 を大腸菌に発現させて精製した酵素を、シコニン生合成経路の各中間体およびそれらの類縁体と反応させた。生成物を HPLC で解析したところ、LeSDR1 は 3”-Hydroxygeranylhydroquinone およびその類縁体に対して NADP（H）依存的な酸化還元活性を有していた。3”-Hydroxygeranylhydroquinone はシコニン生合成経路とエキノフラン生合成経路の分岐に位置する代謝産物であり、LeSDR1 は両経路の切り替えに関与する酵素であることが推測された。

plant, shikonin, SDR

講演番号：2A27p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A27 会場

コーヒーノキにおける Purine Permease の発現及びカフェイン取り込み輸送解析

Expression analysis of purine permease family of *Coffea* plant and the transport analysis of caffeine

○掛川 博文[1]、士反 伸和[2]、永山 秀佳[3]、荻田 信二郎[3]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京大・生存研、[2]神戸薬科大、[3]県立広島大)

○ Hirofumi KAKEGAWA[1], Nobukazu SHITAN[2], Shuka NAGAYAMA[3], Shinjiro OGITA[3], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Kobe Pharmaceutical Univ., [3]Prefectural Univ. of Hiroshima)

コーヒーノキは二次代謝産物としてカフェイン（1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione）を生合成する。プリン環を有する化合物であるカフェインは、嗜好飲料のコーヒーに含まれており、身近な植物アルカロイドの一つである。コーヒーノキは発芽時にカフェインを根から根圏へ分泌する。根圏でのカフェインは、発芽抑制効果を示すアレロケミカルとして機能することや微生物との相互作用に関与することが示唆されている。カフェインは種子に蓄積することから、コーヒーノキ発芽時にカフェインが芽生え地上部から根に輸送され、根圏へ分泌されると考えられる。しかし、コーヒーノキにおけるカフェイン輸送・分泌の機構については明らかになっておらず、また、カフェイン分泌に関与する輸送体も同定されていない。そこで本研究では、コーヒーノキにおけるカフェイン輸送体を明らかにし、カフェイン分泌のメカニズムを解明することを目的とする。

これまでに、根圏への植物代謝物の分泌には、取り込み型輸送体と排出型輸送体の関与が報告されている。アミノ酸輸送においてはシロイヌナズナの根圏への分泌に関わる輸送体の同定例がある。カフェイン分泌においても取り込み型と排出型の両方の輸送体が機能していることが考えられる。Purine permease（PUP） ファミリーのタンパク質にはプリンアルカロイドを輸送するメンバーが報告されており、例えば、シロイヌナズナの AtPUP1 とイネの OsPUP7 はカフェイン取り込み活性を有する。そこで、カフェインの取り込み型輸送体の候補として PUP ファミリーに着目した。コーヒーノキとして、商業的には主に *C. canephora* と *C. arabica* が利用されている。前者は 2 倍体であるのに対し、後者は 4 倍体であり、本研究室において *C. canephora* の培養細胞を維持していることから、本研究においては *Coffea canephora* を用いた。*C. canephora* のゲノム配列から PUP ファミリーを BLASTP を用いて検索したところ、15 種の候補タンパク質が見出された。これらの候補タンパク質の遺伝子 *CcPUP* に対して器官別発現の RNA-seq データをヒートマップで示すとともに、*C. canephora* の培養細胞、再生個体及び、*C. arabica* の植物体を用いて RT-PCR による発現解析を行った。発現解析の結果から根で発現する候補遺伝子 *CcPUP* が複数見出された。これらの候補遺伝子のカフェイン取り込み活性を酵母を用いて行ったところ、カフェイン取り込み活性を示す CcPUP を見出した。

purine permease, *Coffea* plant, caffine

講演番号：2A27p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A27 会場

コーヒー原種 *Coffea charrierana* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と解析

Isolation and characterization of the genes for caffeine synthases from *C. charrierana*.

倉田 陸朗[1]、ポンセット バレリー[2]、デコック アレキサンドラ[2]、○水野 幸一[1]([1]秋田県大生物資源、[2]IRD-モンペリエ DIADE)

Rikurou Kurata[1], Valerie Poncet[2], Alexandre de Kochko[2], ○Kouichi Mizuno[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]IRD Montpellier)

［背景・目的］IRD-モンペリエでは、アフリカ、マダガスカル、中南米など、世界中から様々な *Coffea* 属原種を 50 種類程度コレクションしている。その中で、出自や権益関係が明白であり、かつカフェイン含量について報告のある、*Coffea* 属主要 3 品種を含む 15 原種を研究材料として用いることとした。これら国内では入手困難なコーヒー原種を材料として、カフェイン生合成の分子進化を関連酵素遺伝子の解析から探っていく。これまでの研究で解析の進んでいる、*Coffea arabica* 由来のカフェイン生合成系酵素群の遺伝子に相当するものを、それら原種から単離し比較・解析する。遺伝子レベル・酵素レベル双方からのアプローチにより、*Coffea* 属の中でどのようにしてカフェイン合成能が獲得されてきたのか、その分子進化を探る。今回は、カフェイン含量がきわめて少ないことで知られている、中央アフリカ原産の *C. charrierana* より、カフェイン生合成系酵素遺伝子を単離し、その機能解析を試みたので報告する。

［方法］IRD-モンペリエの温室内で維持・管理されている *C. charrierana* より若葉を採取し、液体窒素で直ちに凍結し、使用時まで-80℃にて保存した。これより全 RNA を抽出し、その一部から cDNA を合成した。これを鋳型として、これまでの我々の研究で明らかにしている *C. arabica* のカフェイン生合成関連酵素の遺伝子情報と機能解析の結果をもとに設計したプライマーを用い、PCR にてそれらの遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子の配列を *C. arabica* 由来の既知遺伝子と比較し分類した。さらに大腸菌を用いた組換え型酵素生産系を確立し、その活性を調べた。

［結果・考察］*C. charrierana* 若葉由来 cDNA より、カフェイン生合成関連酵素遺伝子と相同性のみられる 3 種類の遺伝子（*Cch-CmXRS like*、*Cch-CTS like*、および *Cch-CTgS like*）を単離した。*C. arabica* の対応する酵素とのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 94%、89%、および 91%であった。しかし、はじめの RT-PCR にてカフェイン生合成経路の最後のメチル化を司る CCS 様の遺伝子のみが検出されなかった。組換え型酵素を用いた活性測定の結果、Cch-CmXRS like のみ *C. arabica* の CmXRS1 と同様の、キサントシンから 7-メチルキサントシンを生成する活性を示した。カフェイン含量の低い品種では、遺伝子の低発現や酵素の立体構造上活性に重要である部位・領域に違いがあり、それらが配列上の相違点として認められると考えられ、現在さらに解析を進めている。

coffee, caffeine, molecular evolution

発表責任者：水野幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2A27p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A27 会場

ベラドンナ転写因子 AbERF の機能解析
Functional analysis of transcription factor *AbERF* in *Atropa Belladonna*
○樋口 みのり、橋本 隆、庄司 翼 (奈良先端大バイオ)
○Minori HIGUCHI, Takashi HASHIMOTO, Tsubasa SHOJI (NAIST)

植物は多種多様な二次代謝産物を生合成・蓄積し、自らの防御や繁殖に役立てている。二次代謝産物は医薬、嗜好品、香料、染色などとして広く利用してきた。アルカロイドは窒素を含む塩基性低分子有機化合物の総称である。ナス科にはアルカロイドを生合成する植物種が多く存在する。喫煙習慣性の原因物質ニコチンはタバコのアルカロイドである。また、ジャガイモやトマトは、食中毒の原因となるグルコアルカロイドを生合成・蓄積する。ニコチンとグルコアルカロイドは、化学構造や生合成経路は互いに全く異なるが、いずれの生合成経路も ERF ファミリーに属する相同なジャスモン酸（JA）応答性転写因子(タバコ ERF189、トマト JRE4)によって統括的に制御されている。

ベラドンナ(*Atropa belladonna*) などのナス科薬用植物において、ヒヨスチアミンやスコポラミンなどの薬理活性を有するトロパンアルカロイドは、根で合成され全草に蓄積する。トロパンアルカロイド生合成遺伝子はどのように発現制御されているのかは解明されていない。

タバコ *ERF189* 及びトマト *JRE4* と相同な転写因子遺伝子としてベラドンナ *AbERF1*, *AbERF2, AbERF3* を、NGS データなどをもとに特定した。定量的 RT-PCR 解析により発現の器官特異性と JA などの処理に対する応答性を検討し、*AbERF1*, *AbERF2* はアルカロイド生合成器官である根において強く発現していることが分かった。

AbERF 遺伝子の過剰発現と CREST 法による機能抑制を目的に、*Agrobacterium rhizogenes* を用いて形質転換ベラドンナ毛状根系統を作出した。得られた系統において、ヒヨスチアミンとスコパラミンの蓄積量とアルカロイド生合成酵素遺伝子の発現量を解析することで、AbERF がトロパンアルカロイド生合成制御因子としての機能するのかを検討する。

Atropa belladonna, transcription factor, tropane alkaloid

講演番号：2A27p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A27 会場

栽培種および野生種トマトにおけるα-トマチン代謝酵素遺伝子の機能解析
Characterization of α-tomatine metabolizing enzyme genes in cultivated and wild tomatoes
○秋山 遼太[1]、加藤 純平[1]、李 栄宰[1]、渡辺 文太[2]、中安 大[1]、小林 緑[1]、飯島 陽子[3]、梅基 直行[4]、村中 俊哉[5]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]([1]神戸大院・農、[2]京都大・化研、[3]神奈川工科大・栄養生命、[4]理研・CSRS、[5]大阪大院・工)
○Ryota Akiyama[1], Junpei Kato[1], Hyong Jae Lee[1], Bunta Watanabe[2], Masaru Nakayasu[1], Midori Kobayashi[1], Yoko Iijima[3], Naoyuki Umemoto[4], Toshiya Muranaka[5], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kyoto Univ., [3]KAIT, [4]RIKEN, [5]Osaka Univ.)

ナス科植物であるジャガイモ（*Solanum tuberosum*）やトマト（*S. lycopersicum*）には有毒なステロイドグリコアルカロイド（SGA）が蓄積しており、SGA は動物や昆虫、微生物に対して毒性を示すことから生体防御物質であると考えられる。α-トマチンはトマトの未熟果実や葉、花に多く蓄積している SGA であり苦みを呈するが、果実中の α-トマチンは果実登熟過程で無味無毒なエスクレオシド A へと代謝される。SGA はコレステロールを前駆物質として 16,22,26 位水酸化、26 位アミノ化、E,F 環形成、3 位配糖化を経て生合成される。一方、α-トマチンは 23 位水酸化とアセチル化、27 位水酸化および配糖化を経てエスクレオシド A へ代謝される。これら生合成および代謝反応を触媒する酵素遺伝子については不明であった。我々は α-トマチン代謝反応に関わる酵素遺伝子の同定を行うため、トマトの果実登熟に伴い発現量が増加する遺伝子を候補として選抜し、、我々はトマトのオミックスデータを利用して候補遺伝子を選抜し、組み換え酵素を用いた in vitro 酵素機能解析および、トマトでの過剰発現や遺伝子抑制を行ったので、それらの結果について発表する。一方、野生種トマトの *S. habrochaites, S. pennellii, S. pimpinellifolium* の α-トマチン代謝系には多様性があることから、野生種では栽培種とは異なる代謝酵素が関与すると考えられた。そこで、野生種 *S. habrochaites* から、α-トマチン 23 位水酸化酵素のホモログである *ShDOX2* と *ShDOX4* を単離し機能解析を行った。ShDOX2 と ShDOX4 の組み換え酵素を作成し、トマチンを基質として酵素反応を行い反応産物の大量調製および精製し、NMR による構造解析を行った。その結果、ShDOX2 酵素反応産物は Habrochaitoside A であることが明らかとなった。Habrochaitoside A は *S. habrochaites* に特異的に蓄積する SGA であり、*ShDOX2* の遺伝子発現解析を行ったところ、Habrochaitoside A の蓄積との相関がみられた。一方、ShDOX4 酵素反応産物は栽培種トマトでは検出されない 20-OH-トマチンであることが明らかとなった。

本研究の一部は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業（発展融合ステージ）および総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

Steroidal glycoalkaloids, Tomato

講演番号：2A27p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A27 会場

ジャガイモのステロイドグリコアルカロイド生合成に関わる糖転移酵素の機能解析
Characterization of UGTs responsible for steroidal glycoalkaloid biosynthesis in potato
○中安 大[1]、リ ヒョンゼ[1]、刑部 敬史[2]、刑部 祐里子[2]、杉本 幸裕[1]、村中 俊哉[3]、水谷 正治[1]([1]神戸大院・農、[2]徳島大・生物資源産業、[3]大阪大院・工)
○Masaru NAKAYASU[1], Hyoung Jae LEE[1], Keishi OSAKABE[2], Yuriko OSAKABE[2], Yukihiro SUGIMOTO[1], Toshiya MURANAKA[3], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [2]Bioscience and Bioindustry, Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

ナス科植物であるジャガイモ（*Solanum tuberosum*）はえぐみや食中毒の原因物質であるステロイドグリコアルカロイド（SGA）を多く蓄積している。SGA は分子内に窒素原子を持つステロイドサポニンであり、コレステロールを前駆物質として側鎖 16, 22, 26 位の酸化、26 位へのアミノ基転移、E, F 環形成、3 位水酸基への糖転移を経て生合成される。これまでに多くの生合成遺伝子が単離同定されたが、全ての生合成遺伝子の同定および生合成経路の解明には未だ至っていない。

ジャガイモの主要 SGA であるα-ソラニンとα-チャコニンは 3 位水酸基に結合する 3 糖の構造が異なっており、α-ソラニンはα-L-rhamnosyl-(1→2)-[β-D-glucosyl-(1→3)]-D-galactose（ソラトリオース）、α-チャコニンはα-L-rhamnosyl-(1→2)-[β-L-rhamnosyl-(1→4)]-D-glucose（チャコトリオース）である。これまでに、SGT1 はアグリコンのソラニジン 3 位水酸基にガラクトースを転移しα-ソラニン生合成に関わること、SGT2 はソラニジンにグルコースを転移しα-チャコニン生合成に関わることが報告されており、さらに、SGT3 が 3 糖目のラムノシル化（α1→2）に関わることが報告されている。本研究では、未同定である２つの糖転移段階に関わる遺伝子の同定を目的とした。

既に同定済みの SGA 生合成遺伝子と共発現している２種の UGT(SGT4 と SGT5)を候補遺伝子として選抜した。大腸菌発現系により組換え酵素を作製し、in vitro 機能解析を行った結果、ソラニジン-3-*O*-グリコシドを基質としたとき、SGA4 はラムノース、SGA5 はグルコースをそれぞれ転移する活性を示し、SGA4 はα-チャコニン、SGA5 はα-ソラニンの生合成に関わることが示唆された。次に、in vivo での機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 系を用いて両 UGT 遺伝子をそれぞれ破壊したノックアウト毛状根を作製した。LC-MS を用いて内生 SGA の変動を評価した結果、SGT4 ノックアウト毛状根は内生α-チャコニンが減少し、一方、SGT5 ノックアウト毛状根では内生α-ソラニンが減少した。以上の結果から、SGA4 はチャコニン生合成におけるラムノース転移（β1→4）を、SGA5 はソラニン生合成におけるグルコース転移（β1→3）をそれぞれ触媒することを明らかとした。

本研究の一部は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業（発展融合ステージ）によって実施した。

Solanum tuberosum, Steroidal glycoalkaloid, UGT

発表責任者：水谷　正治（mizutani@gold.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2A27p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A27 会場

ハナビシソウにおけるイソキノリンアルカロイド生合成遺伝子の発現ネットワーク解析
Transcriptional gene network analysis in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*

○西田 昇平[1]、山田 泰之[2]、佐藤 文彦[1] ([1]京大院生命、[2]神戸薬科大)
○Shohei NISHIDA[1], Yasuyuki YAMADA[2], Fumihiko SATO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kobe Pharma. Univ.)

高等植物は多種多様な二次代謝産物を生産する。中でも含窒素塩基性化合物であるアルカロイドは強い生理活性を持ち、医薬品等に用いられている。これらの有用代謝物質を大量生産するために、代謝工学を用いた生合成系の転写制御の研究が進められている。現在、イソキノリンアルカロイド(IQA)生合成経路の解明はほぼ完了しているが、転写制御に関する知見は少ない。これまでの研究において、アルカロイド生合成系の発現制御には AP2/ERF 型、WRKY 型、bHLH 型転写因子などの関与が報告されているが、IQA 生合成系においても、オウレンにおいて WRKY 型転写因子(CjWRKY1)、bHLH 型転写因子(CjbHLH1)、また、ハナビシソウにおいて EcbHLH1-1, 1-2 が同定されている[1)]。一方、これらの因子は生合成酵素遺伝子の発現制御においてネットワークを構成し、機能していると考えられる。本研究ではドラフトゲノム解析しているハナビシソウを材料に、IQA 生合成遺伝子の転写制御に関わる新たな因子の探索とその制御ネットワークの解明を試みた。

これまでに IQA 生合成系で同定されている WRKY 型、bHLH 型転写因子と共に IQA 生合成系における関与が不明であった AP2/ERF 型転写因子をカタログ化し、既知の転写因子と合わせて分子系統樹を作成した。得られた系統樹を比較解析し、アルカロイド生合成に関与していると推定される転写因子遺伝子を選択すると共に、MeJA 処理を行ったハナビシソウの芽生えにおける遺伝子発現を解析した。さらに、IQA 産生能の異なる培養細胞株における遺伝子発現を解析することで、これら転写因子の MeJA 応答性、IQA 生合成との相関を解析した。その結果、IQA 生合成に関与すると考えられる bHLH 型、WRKY 型、AP2/ERF 型転写因子を、それぞれ 3, 3, 6 個見出し、それらの転写因子の生合成酵素遺伝子に対する転写活性能を解析した。

さらに、より詳細な転写制御ネットワークを解明するために、ハナビシソウの培養細胞と芽生えに MeJA 処理した場合の発現 RNA の経時変化を解析した。以上の結果から、IQA 生合成制御における bHLH 型、AP2/ERF 型、WRKY 型転写因子の役割について議論する。

1) Yamada, Y et al. 2015. CjbHLH1 homologs regulate sanguinarine biosynthesis in *Eschscholzia californica* cells. Plant and Cell Physiology, 56(5), 1019-30

Secondary metabolism, Transcription factor, *Eschscholzia californica*

発表責任者：西田昇平（nishida.shohei.26s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A27p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A27 会場

ウマノスズクサにおけるアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の探索と機能解析(II)

Characterization of OMTs and P450s involved in aristolochic acid biosynthesis in *Aristolochia debilis* (II)

○松井 俊樹、佐藤 文彦（京大院・生命）
○Toshiki MATSUI, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

アリストロキア酸はウマノスズクサ属植物に含まれるイソキノリンアルカロイド(IQA)である。ウマノスズクサ科のウスバサイシンは生薬であるが、地上部に蓄積するアリストロキア酸の混入により、アリストロキア腎症やバルカン腎症、尿路上皮癌の発症が報告され、その代謝工学による除去が望まれている。アリストロキア酸はニトロ基を有する稀な天然化合物であり、IQA 共通経路で生合成されたのちウマノスズクサ属に特有のシトクロム P450 および *O*-メチル化酵素(OMT)によって産生されると推定されているが、その詳細は不明である。本研究では、アリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離・同定を目的として、昨年度に引き続き、ウマノスズクサ培養細胞、再分化シュートのトランスクリプトームデータ解析と生合成酵素の機能解析を行った。本年度は、特にアリストロキア酸生合成に必要な 3'位水酸基のメチル化を触媒する OMT の同定を目的とした。まず、ハナビシソウにおいて単離した 3'*O*-メチル化酵素(G3OMT)[1] 配列を用いて G3OMT と相同性が高く、シュートで高発現する遺伝子を選抜した。引き続き、候補とした遺伝子の機能解析を、大腸菌発現系を用いて行った。その結果、同候補酵素がスコウレリンを基質として 2 位の *O*-メチル化を行うことを見出した。また、同酵素は 2-*O*-メチルスコウレリン以外の生成物も生じており、現在その解析を進めている。なお、同酵素のスコウレリン以外の基質に対する酵素活性については現在解析中である。同時に、他の OMT や P450 配列の解析も進めており、これらの結果についても併せて報告する。

1) Purwanto et al., *Plant Cell Physiology.*, 58 (9), 1528-1540 (2017)

isoquinoline alkaloid, *O*-methyltransferase, cytochrome P450

講演番号：2A27p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A27 会場

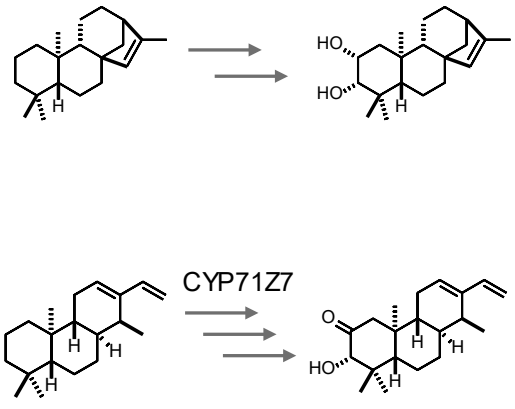
CYP71Z6 と CYP71Z7 の詳細な酵素機能

Enzyme activities of CYP71Z6 and CYP71Z7

○北岡 直樹[1]、WU Yisheng[2]、PETERS Reuben J.[2] ([1]富山県大工、[2]アイオワ州立大)
○Naoki KITAOKA[1], Yisheng WU[2], Reuben J. PETERS[2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Iowa St. Univ.)

【背景】イネ（*Oryza sativa*）は多種多様なジテルペノイドを生合成している。それらジテルペノイドの化学構造の多様性は、テルペン合成酵素によって形成される炭素骨格と、シトクロム P450 などの酸化酵素により導入される官能基によってもたらされる。イネは２番染色体と４番染色体上にジテルペノイド生合成遺伝子クラスターを有しており、それら遺伝子クラスター上の遺伝子群を中心にジテルペノイドの生合成機構解明を目指して研究が進められてきた。本発表においては、２番染色体上の生合成遺伝子クラスターに存在し、それぞれ *ent*-isokaurene (**1**)と *ent*-cassadiene (**2**)の２位に水酸基を導入することが明らかとなっていた CYP71Z6 と CYP71Z7[1)]の詳細な酵素機能について報告する。

【方法と結果】ゲラニルゲラニル二リン酸の生合成に関わる遺伝子群に加えて、各種のテルペン合成酵素を導入した大腸菌に、*CYP71Z6* もしくは *CYP71Z7* を導入し生成物を調べた。その結果、*ent*-isokaurene (**1**)を生産する大腸菌に *CYP71Z6* を導入することにより、２位と３位に水酸基が導入された 2α,3α-dihydroxy-*ent*-isokaurene (**4**)が得られた。その一方で、*ent*-cassadiene (**2**)を生産する大腸菌に *CYP71Z7* を導入することにより、2α-hydroxy-*ent*-cassadiene (**5**)の水酸基がカルボニル基まで酸化された *ent*-cassadien-2-one (**6**)と、さらに３位に水酸基が導入された 3α-hydroxy-*ent*-cassadien-2-one (**7**)が生成した。これら結果より、CYP71Z6 は *ent*-isokaurene (**1**)の２位と３位の連続した水酸化反応を触媒し、CYP71Z7 は *ent*-cassadiene の２位のメチレンをカルボニル基まで酸化した後に、３位に水酸化基を導入する３段階の酸化反応を触媒することが示唆された。生産量は少ないものの *ent*-cassadiene (**2**)を生産する大腸菌に *CYP71Z6* を導入した場合や、*ent*-isokaurene (**1**)を生産する大腸菌に *CYP71Z7* を導入した場合も酸化修飾された化合物が得られた。また、*ent*-sandaracopimaradiene (**8**)を生産する大腸菌に *CYP71Z7* を導入したところ２位あるいは３位に水酸基が導入された化合物が得られた。



1)Wu et al., *FEBS Lett.*, 585, 3446-3451 (2011).

cytochrome P450, terpenoid, phytoalexin

講演番号：2A27p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A27 会場

みどりの香り組成を制御する酵素、ヘキセナール還元酵素の同定とその機能の解明

Identification of hexenal reductase that regulates composition of green leaf volatiles

田中 俊之[1]、池田 彩菜[1]、志岐 和美[1]、国広（長井） 直子[1]、大和 勝幸[2]、道羅 英夫[3]、大西 利幸[4]、肥塚 崇男[1]、○松井 健二[1] ([1]山口大院創成科学、[2]近畿大生物理工、[3]静岡大グリーン科技研、[4]静岡大農)

Toshiyuki Tanaka[1], Ayana Ikeda[1], Kazumi Shiki[1], Naoko Kunihiro (Nagai)[1], Katsuyuki Yamato[2], Hideo Dohra[3], Toshiyuki Ohnishi[4], Takao Koeduka[1], ○Kenji Matsui[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kindai Univ., [3]Shizuoka Univ., Green Institute, [4]Shizuoka Univ. Fac. Agric.)

陸上被子植物のほぼ全種が炭素数 6(C6)の揮発性アルデヒド、アルコール、エステルを主成分とするみどりの香り(GLVs)生成能力を有している。GLVs は無傷な植物組織ではほとんど生成されないが組織が病傷害を受け、細胞が損傷を受けると数秒以内に生成される。こうした傷口での GLVs の生成は傷口からの病原菌などの侵入者を防ぐ直接防衛と傷の原因となっている植食者の天敵を誘引する間接防衛を担っている。損傷を受けた細胞で最初に生成されるのはヘキセナールなどの C6 アルデヒドであるが、C6 アルデヒドは比較的速やかに還元され C6 アルコールに変換される。変換された C6 アルコールの一部はアセチル CoA からアセチル基を受け取りエステルへと変換される。GLVs の直接防衛効果、間接防衛効果には GLVs の生成量だけでなくその組成比が重要であるケースが報告されている。これまで C6 アルデヒドから C6 アルコールへの還元はアルコール脱水素酵素が関与していると考えられてきたが、私たちはこの還元には NADPH が補酵素として必須であることを見いだし、C6 アルデヒドに比較的特異的なヘキセナール還元酵素が関与していることを提唱してきた。本研究ではシロイヌナズナ葉にヘキセナール還元酵素活性を確認し、精製、クローニングし、その機能を明らかにすることを目的とした。

シロイヌナズナ葉のヘキセナール還元酵素を葉粗抽出液の硫安分画と疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーでほぼ均一にまで精製した。精製酵素は補酵素としてほぼ NADPH のみを利用でき、(*Z*)-3-ヘキセナールや *n*-ヘプタナールなど炭素数５～８の直鎖アルデヒドやフルフラールなどの芳香族アルデヒドを良い基質としたが、シナピルアルデヒドなど芳香環に修飾を有する芳香族アルデヒドはほとんど基質としなかった。精製酵素の内部配列はシロイヌナズナシンナムアルコール脱水素酵素 7 と名付けられた遺伝子がコードする配列と完全に一致した。本遺伝子 cDNA を大腸菌発現し、組換え酵素の諸性質を精製酵素と比較したところほぼ完全に一致した。当該遺伝子の T-DNA 挿入変異体シロイヌナズナ葉に部分傷を与えると C6 アルコールと C6 アルコールから生成される C6 エステルの生成がほぼ完全に抑制されていた。また T-DNA 挿入変異体シロイヌナズナを(*Z*)-3-ヘキセナールの蒸気に曝すと野生株に比べ低い濃度で光合成能の低下が認められた。このため、ヘキセナール還元酵素は一義的にはヘキセナールなどの活性揮発性アルデヒド化合物をアルコールに還元して解毒する機能を担っている可能性が示唆された。

Green leaf volatiles, Hexenal reductase, Reactive carbonyl species

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2A27p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A27 会場

ビワの花の含窒素香気成分の生合成に関与するシトクロム P450 の探索と性状解析
Identification and characterization of a cytochrome P450 involved in nitrogenous floral volatiles of loquat

○山口 拓也[1]、松井 祐美[2]、松本 宏[1]、桑原 保正[3,4]、浅野 泰久[3,4]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・生物、[3]富山県大工・生工研セ、[4]JST, ERATO）
○Takuya Yamaguchi[1], Yumi Matsui[2], Hiroshi Matsumoto[1], Yasumasa Kuwahara[3,4], Yasuhisa Asano[3,4] ([1]Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Col. Biol. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]Toyama Pref. Univ., [4]ERATO, JST)

植物の生殖器官である花の香気成分は、花粉媒介昆虫の誘引と、植食性昆虫や病原体に対する化学防御に関与している。花の香気成分はベンゼノイド、テルペノイド、脂肪酸誘導体から構成されることが多いが、ビワ (*Eriobotrya japonica*) の花は特徴的な成分として、含窒素化合物であるフェニルアセトアルドキシム、(2-ニトロ)エチルベンゼンおよびフェニルアセトニトリルを放出する (1)。これらの化合物は L-フェニルアラニンから生合成される。すなわち、L-フェニルアラニンがフェニルアセトアルドキシムに変換され、フェニルアセトアルドキシムが(2-ニトロ)エチルベンゼンまたはフェニルアセトニトリルへと変換される。フェニルアセトアルドキシムはウメ (*Prunus mume*) の青酸配糖体生合成経路の中間体であり、シトクロム P450 (CYP79D16) が L-フェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムに変換する (2)。また、ビワも青酸配糖体を蓄積し、ウメとビワは共通してヒドロキシニトリルリアーゼを有している (3)。以上のことから、ビワの含窒素香気成分生合成の初発反応に CYP79 が関与すると推察された。そこで本研究では、ビワの花から CYP79 を見出し、性状解析を行った。

ビワの花と葉から RNA を抽出し、次世代シークエンサーを用いた発現差異解析を行った。その結果、花で高発現する 6802 のコンティグが認められ、シトクロム P450 をコードする配列は 48 種であった。これらのうち、CYP79 ファミリーに属する配列が 1 種認められ、CYP79D16 と 79%の相同性を有していた。そこで、ビワの CYP79 (EjapCYP79) をコードする cDNA をクローニングした。さらに EjapCYP79 とシトクロム P450 のレドックスパートナーであるシトクロム P450 レダクターゼの共発現系を出芽酵母において構築し、形質転換体による L-フェニルアラニンの代謝能を検討した。その結果、EjapCYP79 は L-フェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムに変換することが明らかになった。

(1) Kuwahara, Ichiki, Morita, Asano, *Biosci., Biotechnol., Biochem*., **78**, 1320-1323 (2014).
(2) Yamaguchi, Yamamoto, Asano, *Plant Mol. Biol.*, **86**, 215-223 (2014).
(3) Ueatrongchit, Kayo, Komeda, Asano, H-Kittikun, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72** (6), 1513-1522 (2008).

cytochrome P450, loquat, floral volatile

発表責任者：山口拓也（yamaguchi.takuya.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A27p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A27 会場

ゴマのアントラキノン類生産における推定生合成中間体

Possible biosynthetic intermediates for anthraquinone production in sesame

○古本 敏夫、佐藤 龍太（香川大農）
○Toshio FURUMOTO, Ryuta SATO (Kagawa Univ.)

【背景・目的】

ゴマ（*Sesamum indicum* L.）は、ゴマ科ゴマ属に属する一年性作物であり、その根や培養根において C_6 側鎖を持つアントラキノン類を生産している。また、黒ゴマ種子には、同じ炭素骨格を持ち、強い抗酸化性を示すアントラキノン（アントラセサモンＦ）が含まれている。これらゴマが生産するアントラキノン類の生合成経路において、それらの化学構造や他の植物によって生産されているキノン類の生合成経路との比較から、2-(4-methylpent-3-en-1-yl)anthraquinone（MPAQ）および 2-geranyl-1,4-naphthohydroquinone（GNHQ）が共通の生合成中間体である可能性が高いと推測されているが、まだ実験的には証明されていない。そこで本研究では、MPAQ や GNHQ がゴマ根で生産されているアントラキノン類の生合成中間体として働くのかどうかを明らかにすることを目的として、安定同位体標識したこれら推定生合成中間体を用いたゴマ培養根への投与実験を行った。

【方法・結果】

市販の重水素化ナフタレン（99 atom% D）を出発物質として、目的化合物である重水素標識 MPAQ を３段階で合成した。また、重水素標識 GNHQ も同様に重水素化ナフタレンから３段階で合成した。

これら標識化合物をゴマ培養根に投与した後、培養物から各種クロマトグラフィーを用いてアントラキノン類を分離・精製し、代謝変換の有無を調べた。

その結果、投与した MPAQ は、その側鎖部分が脱水素化された化合物である（*Z*）-MPDEAQ に変換されていることが示された。また、投与した GNHQ は、（*Z*）-MPDEAQ への変換と共に、MPAQ にも変換されていることが示された。以上より、GNHQ の環化反応により MPAQ が生成し、その後の脱水素反応により（*Z*）-MPDEAQ が生成する生合成経路を明らかにすることができた。

一方、投与した MPAQ と GNHQ はどちらも、MPAQ のアントラキノン環部分がヒドロキシ化された化合物であるアントラセサモン B やそのエポキシ体（2,3-エポキシアントラセサモン B）には変換されていないことが示された。従って、MPAQ と GNHQ はゴマ根によるアントラキノン類生産における共通の生合成中間体ではなく、アントラセサモン B などの生成においては未同定の生合成中間体が関与している可能性が示唆された。

anthraquinone, biosynthesis, sesame

講演番号：2A27p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A27 会場

オウレンのイソキノリンアルカロイド生合成系を制御する AP2/ERF 型転写因子の機能解析

Characterization of AP2/ERF transcription factors involved in the regulation of isoquinoline alkaloid biosynthesis in Coptis japonica

○山田 泰之[1]、西田 昇平[2]、士反 伸和[1]、佐藤 文彦[2]([1]神戸薬大、[2]京大院生命)
○Yasuyuki Yamada[1], Shouhei Nishida[2], Nobukazu Shitan[1], Fumihiko Sato[2] ([1]Kobe Pharma. Univ., [2]Kyoto Univ.)

キンポウゲ科のオウレン(*Coptis japonica*)が産生するイソキノリンアルカロイド (IQA)、ベルベリンの生合成系は CjWRKY1 や CjbHLH1 といった転写因子によって制御されることが明らかとなっている[1]。一方で、これらの転写因子を単独で過剰発現させたとしても IQA の生産性に大きな変化は見られなかった[2]。したがって、安定した IQA 生産制御系の構築のためには、より広範な IQA 生合成系の制御機構と転写因子ネットワークの理解が求められる。我々は、ベルベリン生合成酵素遺伝子のプロモーター領域の解析から、新たに AP2/ERF 型 (以下 ERF)転写因子が機能している可能性を見出し[3]、IQA 生合成系の転写ネットワークの解明と代謝工学への応用を目的に、新規 ERF 転写因子の探索とその機能解析を行った。

ERF 転写因子の探索には、ドラフトゲノム解析が進行中のケシ科のハナビシソウ (*Eschscholzia californica*)を最初に用いた。主要な転写因子ファミリーの抽出とスクリーニングから、IQA 生合成系との関わりが示唆される、Group IX サブファミリーに属する ERF 転写因子が複数見出され、これらの配列情報をもとに、オウレンからも 5 つの ERF 転写因子 (以下、CjERF)を単離した。これら *CjERF* 遺伝子は全て、IQA 生産を誘導するメチルジャスモン酸 (MeJA)処理により発現が上昇していた。また、オウレンプロトプラストを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、ベルベリン生合成酵素遺伝子プロモーターに対する転写誘導活性も示された。これらの転写活性は、ERF の標的配列と推測される GCC-box の変異により低下していたことから、CjERF も同様な DNA 配列に結合する可能性が示唆された。さらに、dsRNA の導入により *CjERF* 遺伝子の発現を一過的に抑制すると、IQA 生合成酵素遺伝子群の発現量が低下し、逆に *CjERF* 遺伝子を一過的に過剰発現させると、IQA 生合成酵素遺伝子群の発現量が上昇することも示された。以上の結果から、CjERF が IQA 生合成系の転写活性化因子として機能している可能性が示唆された。現在、CjERF と標的 DNA 配列との結合性に関してより詳細な解析を進めている。

1. Yamada and Sato, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 305, 339-382 (2013)
2. Yamada et al., *PLoS One*, 12, e0186953 (2017)
3. Yamada et al., *Front Plant Sci.*, 7, 1352 (2016)

Isoquinoline alkaloid, *Coptis japonica*, AP2/ERF transcription factor

発表責任者：山田泰之（yyamada@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2A27p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A27 会場

CRISPR/Cas9 system を用いたオウレンゲノム編集細胞の作製と一細胞解析
CRISPR/Cas9 based genome editing of *Coptis japonica* cells and single cell analysis
○浜 竜哉[1]、西尾 洋[1]、山田 泰之[2]、佐藤 文彦[1] ([1]京大・院　生命、[2]神戸薬科大)
○Ryuya HAMA[1], Hiroshi NISHIO[1], Yasuyuki YAMADA[2], Fumihiko SATO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kobe Pharm. Univ.)

部位特異的なゲノム改変技術として、近年 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9 システムが注目されている。同システムでは guide RNA(gRNA)によって誘導される Cas9 が標的配列を特異的に切断することにより遺伝子の欠損、挿入が引き起こされる。gRNA による標的配列の設計は容易であるために広範な遺伝子改変が可能である。現在、この技術はシロイヌナズナやタバコのようなモデル植物のみならず様々な植物種において利用が進められているが、有用二次代謝産生植物種への適用例は少ない。本発表では、イソキノリンアルカロイド(IQA)を産生する薬用植物オウレン(*Coptis japonica*)におけるゲノム編集、並びに一細胞分析の可能性を検討した。

まず、オウレンにおいて gRNA 発現に用いる U6 プロモーターを探索し、ケシ科植物ハナビシソウ(*Eschscholzia californica*)の U6 プロモーターを用いることにより、オウレンプロトプラストでも標的遺伝子に対する変異の導入が可能であることを示した。さらに、標的配列に相同な配列を持つドナーDNA として GFP 遺伝子を同時導入することにより、相同組み換えを用いた GFP ノックインにも成功した。以上の解析は比較的発現量の高い IQA 生合成酵素である norcoclaurine 6-OMT を標的として行ったものであるが、より発現量の低い転写因子への応用が可能かどうかを次に検討した。その結果、IQA 生合成系の転写因子である *Cj*WRKY1, *Cj*bHLH1 においてもゲノム編集が可能であることを見いだした。ゲノム編集した細胞における IQA 生合成酵素遺伝子の発現量を解析することを目指して、これらの転写因子を標的とした GFP ノックインを行い、*Cj*WRKY1 において GFP のノックインが認められた。引き続き一細胞レベルで遺伝子発現解析を試み、予備的ではあるが、分析が可能であると思われるデータが得られ、現在追試を行っている。さらに、新規な転写因子と想定される *Cj*ERF1a, 2a, 8a, 12a, 17a に関しても同様の解析を検討しており、遺伝子発現ネットワークの解明を試みている。これらの結果についてもあわせて報告する。

genome editing, secondary metabolism, single cell analysis

発表責任者：浜竜哉（hama.ryuya.36m@kyoto-u.jp）

講演番号：2A28a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A28 会場

トマトのソラナコール生合成における芳香環形成経路

Aromatic ring formation pathways in tomato solanacol biosynthesis

○野上 香奈[1]、米山 香織[2]、野村 崇人[3]、米山 弘一[3]、秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]愛媛大院・農、[3]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)
○Kana Nokami[1], Kaori Yoneyama[2], Takahito Nomura[3], Koichi Yoneyama[3], Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Ehime Univ., [3]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン (strigolactone, SL) はシュート分岐を制御する植物ホルモンであると同時に，AM 菌や根寄生雑草に対する根圏情報伝達物質としても作用する。SL のほとんどは A 環にシクロヘキセン環を有する四環性の 5-デオキシストリゴール (5-deoxystrigol, 5DS) あるいは 4-デオキシオロバンコール (4-deoxyorobanchol, 4DO) を基本骨格としている。それらとは異なり，ナス科植物の主要な SL の一種であるソラナコールは A 環にベンゼン環を持つ芳香族 SL である。SL の生合成には β-カロテンを出発基質として BC 環を持たないカーラクトン(carlactone, CL) を経由する共通の経路の存在が明らかになっている。CL より下流において働く酵素として P450 に属する MAX1 および 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼである LBO が報告されている。ソラナコールも CL を経由し，四環性 SL 形成後に A 環がベンゼン環に変換されて生合成されると推定されている。一方，緑色硫黄細菌やある種の放線菌はソラナコールと同じ置換様式のベンゼン環を持つ芳香族カロテノイドを産生することから，CL の A 環が先にベンゼン環に変換された後に四環性骨格が形成されソラナコールが生成する可能性も存在する。昨年度の本大会において，我々はソラナコールと同じ置換様式のベンゼン環を持つソラナコール型カーラクトン（solanacol type carlactone, SlCL）類を新規に合成し，これらがトマト MAX1 および LBO の組換え酵素により CL 類と同様の酸化変換を受けることを報告した。今年度は，これら 2 つの経路についてさらに検討するため，4DO とオロバンコール，そして，SlCL 類の安定同位体ラベル化合物のトマト根における変換について精査することとした。

【方法・結果】四環性 SL 形成後に A 環がベンゼン環に変換される経路について調べることを目的として，トマト根にフルリドン存在下で [8-CD_3]-4DO および[8-CD_3]-オロバンコールをそれぞれ投与し，変換産物の LC-MS/MS 分析を行った。その結果，[8-CD_3]-オロバンコールはソラナコールやダイデヒドロオロバンコールに変換されたが，[8-CD_3]-4DO は変換されなかった。このことから， 4DO を経由しない経路により生合成されたオロバンコールを前駆体としてソラナコールが生産される経路の存在が強く示唆された。

取り込み実験に供する重水素ラベル SlCL 類として，[10-D_1]-および[15-D_3]-SlCL の合成を進めている。それぞれの重水素ラベル導入は，tris(methyl-d_3)sulfonium iodide を用いた芳香族ヨノンの Corey-Chaykovsky エポキシ化, 5-bromo-3-(methyl-d_3)furan-2(5H)-one を用いた C_{14}-アルデヒドの *O*-アルキル化により行っている。

strigolactone, carlactone, Solanum lycopersicum

発表責任者：秋山康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A28a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A28 会場

ミヤコグサ 5DS 生合成における MAX1 下流経路の解析

Studies on the *Lotus japonicus* 5DS biosynthetic pathway downstream of MAX1

○森 愛美[1]、米山 香織[2]、謝 肖男[3]、野村 崇人[3]、米山 弘一[3]、秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]愛媛大院・農学、[3]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)
○Narumi MORI[1], Kaori YONEYAMA[2], Xiaonan XIE[3], Takahito NONURA[3], Koichi YONEYAMA[3], Kohki AKIYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Ehime Univ., [3]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン (strigolactone, SL) は植物が生産する根圏情報物質であり，枝分かれを抑制する内生ホルモンでもある。SL 生合成において，イネの MAX1 のひとつである Os900 は SL 前駆体 carlactone (CL) からオロバンコール型 SL である 4-deoxyorobanchol (4DO) を生成するが，ストリゴール型の SL の骨格を形成する経路は未だ未解明である。これまでに我々はストリゴール型 SL の生合成機構を解明することを目的として，ストリゴール型 SL の 5-deoxystrigol (5DS) を主に生産するミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に注目してきた。昨年度の本大会において，ミヤコグサ MAX1 は CL を 18-hydroxycarlactonoic acid (18-HO-CLA) に変換するが，5DS は生成しないこと，また，安定同位体ラベルした carlactonoic acid (CLA) および methyl 18-hydroxycarlactonoate (18-HO-MeCLA) のミヤコグサの根の取り込み実験により, 18-HO-CLA は CLA から生成する 5DS の前駆体であることを明らかにした。これらのことは，ミヤコグサにおいての BC 環の形成は MAX1 の下流に存在している別の酵素が担うことを示唆している。今年度の本大会では，ミヤコグサにおける 18-HO-CLA から 5DS に変換する経路に着目し，それに関与すると考えられる SL 生合成遺伝子 LBO ホモログの解析およびトリアゾール系 4DO 生合成阻害剤 TIS108 の阻害作用の分析を行った。

【結果と考察】LBO は MAX1 の下流に存在する 2-オキソグルタル酸依存性デヒドロゲナーゼである。ミヤコグサ LBO をクローニングし，MeCLA 変換実験を行った。ミヤコグサ LBO はシロイヌナズナ LBO と同様に MeCLA から MeCLA+16 体を生成した。また，反応液中には CLA も検出された。18-HO-MeCLA を基質とした変換実験では 18-HO-CLA が生成した。さらに LORE1 (Lotus Retrotransposon 1) ミヤコグサ内在性レトロトランスポゾンを利用した遺伝子タギング集団から LBO 欠損変異体を得，5DS 生産について調べた。その結果，LBO 欠損変異体も野生型と同程度の 5DS を生産していたことから，ミヤコグサ LBO は 5DS の生合成遺伝子ではないことが示唆された。

TIS108 は 2012 年 Ito らによって創製されたイネにおける 4DO 生合成阻害剤である。ミヤコグサの水耕液に TIS108 を添加し，3 日後の SL 生成量を分析した。TIS108 添加により 5DS および methyl lotuslactonoate の分泌量が減少し，CLA および 18-HO-CLA が蓄積していることが分かった。このことは TIS108 の阻害点が MAX1 ではなく，MAX1 の下流に存在する別の P450 である可能性を示唆している。

現在，5DS 生産量と発現が相関する MAX1 の下流の生合成酵素候補遺伝子の探索を行っている。

strigolactone, biosynthesis, *Lotus japonicus*

講演番号：2A28a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A28 会場

シダ植物におけるストリゴラクトン生合成
Strigolactone biosynthesis in ferns
○依田 彬義[1]、佐藤 智康[1]、米山 香織[2,3]、謝 肖男[1,2]、森 愛美[4]、秋山 康紀[4]、横田 孝雄[5]、米山 弘一[2]、野村 崇人[1,2] ([1]宇都宮大院・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]愛媛大・農、[4]大阪府立大院・生命環境、[5]帝京大・バイオ)
○Akiyoshi Yoda[1], Tomoyasu Sato[1], Kaori Yoneyama[2,3], Xiaonan Xie[1,2], Narumi Mori[4], Kohki Akiyama[4], Takao Yokota[5], Koichi Yoneyama[2], Takahito Nomura[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Fuc. of Agri., Ehime Univ., [4]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [5]Dept of Biosci., Teikyo Univ.)

【目的】
ストリゴラクトン(SL)は根寄生植物の種子発芽刺激やアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導、植物の枝分かれ抑制などの機能を持つ植物ホルモンである。これまでに 20 種類以上の SL が単離・構造決定されている。典型的な SL の化学構造は 3 環性のラクトン（ABC 環）とブテノライド（D 環）がエノールエーテル結合したものである。一方、近年、様々な植物種から BC 環を持たない非典型的な SL も単離されている。なぜ、植物は多様な SL を生産するのか、また、どの化学構造が活性本体なのかは解っていない。SL の構造と植物進化の関係を考察するために、これまでに我々はヒカゲノカズラ植物（小葉シダ類）のイヌカタヒバ（*Selaginella moellendoffii*）が生産する SL の分析を行った。その結果、イヌカタヒバは典型的な SL の基本骨格をもつ 4-デオキシオロバンコール（4DO）を生産していることを明らかにしている。さらに本研究では、ヒカゲノカズラ植物のあとに分岐したシダ植物（大葉シダ類）の SL 生合成を明らかにするために、ゼンマイ（*Osmunda japonica*）とスギナ（*Equisetum arvense*）を選び、それらが生産する SL の分析を行った。
【方法・結果】
ゼンマイとスギナを水耕栽培し、水耕液から活性炭を用いて根浸出物を吸着させた。活性炭をアセトンで溶出し、減圧濃縮した。得られた水性残渣を酢酸エチルで抽出し、それら抽出物を LC-MS/MS を用いて分析した。その結果、ゼンマイとスギナは、イヌカタヒバと同様に 4DO を生産していることが明らかとなった。真葉植物（種子植物と大葉シダ類）から 4.2 億年前に分岐したイヌカタヒバと 3.6 億年前に大葉シダ類の初期にそれぞれに分岐したと考えられているゼンマイとスギナが 4DO を生産していたことから、4DO は維管束植物の共通祖先にとって重要な根圏シグナル物質だったのではないかと推測された。

phytohormone, strigolactone, biosynthesis

講演番号：2A28a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A28 会場

種子発芽におけるストリゴラクトン作用と転写因子 NF-YC の関連性
Functional relationship between strigolactone and Nuclear Factor YC in seed germination
○石川 尭彦、池上 佳菜子、姜 凱、高橋 郁夫、水野 翼、中村 英光（東大農生科）
○Takahiko ISHIKAWA, Kanako IKEGAMI, Kai JIANG, Ikuo TAKAHASHI, Tsubasa MIZUNO, Hidemitsu NAKAMURA (Tokyo Univ.)

【背景と目的】
ストリゴラクトン(SL)は分げつ数を抑える、栄養欠乏耐性を付加させるといった農業上、有用な植物ホルモンである。その研究は近年急激に発展しているが、その作用機構、特にシグナル下流因子には不明な点が多い。我々は昨年度大会で、SL 受容体 D14 と SL 依存的に相互作用する因子として NF-YC を特定し、シロイヌナズナでの過剰発現株の形態を報告した。NF-YC は真核生物に広く保存されている転写因子 NF-Y のサブユニットであり、動物では分化やガンに関連する因子として研究が進んでいる一方で、植物においては複数のホモログが存在し機能重複が見られるため、機能解析は難航している。このうちの一つである *NF-YC3* の過剰発現株(*NF-YC3*ox)では花茎数の減少といった SL と関連する形態とともに、花茎の伸長のような興味深い形態も示された。今回、その変異株のさらなる形態の探索や、分子間相互作用解析を通して NF-YC3 の機能解析や作用メカニズムの追究を行った。
【方法と結果】
*NF-YC3*ox に SL 受容、シグナル伝達因子である *D14* もしくは *MAX2* の機能欠損株を掛け合わせたところ、花茎長は *NF-YC3*ox と同様増加していた一方で、花茎数の減少は見られなくなった。また GA 生合成阻害剤である PAC 存在下での *NF-YC3*ox の発芽率は促進されていた一方で、*MAX2* 機能欠損株と掛け合わせた場合にもその形質は失われた。これらのことから、NF-YC3 の予測される機能のうち、花茎の伸長においては SL 以外の植物ホルモン、例えば GA、が関わっている一方で、花茎数の減少や発芽促進には SL が関連しているのではないかと仮説を立てた。本発表ではそのうち、発芽に焦点を当てた作用メカニズムの追究について報告する。吸水後の種子から RNA を抽出し、RT-qPCR により発芽に関わる他の植物ホルモンである GA のマーカー遺伝子の転写量を調べたところ、特に促進されている様子もなく、また ABA への感受性も促進されてはいなかったため、これらの植物ホルモンを介しての発芽促進ではないと示唆され、SL の関与について調べることにした。D14 とは別のサブファミリーに属し、D14 よりも発芽に関与する KAI2 とも NF-YC3 は相互作用が見られるのかを調べるため、タバコの一過性発現系を用いて BiFC 法により結合能を調べた。すると D14 同様、KAI2 も NF-YC3 との相互作用を示したことから、*NF-YC3*ox における発芽促進は KAI2 を介している可能性も考えられ、現在その検証を行っている。

Strigolactone, Nuclear Factor Y, germination

講演番号：2A28a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A28 会場

新規ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索
Screening for novel strigolactone biosynthesis inhibitors
○伊藤 晋作[1]、川田 紘二郎[1]、新井 美乃里[1]、佐藤 美咲[1]、久家 滉太[1]、佐々木 康幸[1]、野村 崇人[2]、浅見 忠男[3]、矢嶋 俊介[1]([1]東農大バイオ、[2]宇都宮大、[3]東大院農生科応生化)
○Shinsaku ITO[1], Kojiro KAWADA[1], Minori ARAI[1], Misaki SATO[1], Kota KUGA[1], Yasuyuki SASAKI[1], Takahito NOMURA[2], Tad ASAMI[3], Shunpike YAJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Utsunomiya Univ., [3]Univ. of Tokyo)

背景

ストリゴラクトン（SL）は植物の生産するカロテノイド由来物質であり、根寄生雑草の発芽、アーバスキュラー菌根菌との共生、枝分かれの制御に働いていることが知られている。我々はこれまでに SL 生合成阻害剤として TIS108 を見出してきた。TIS108 を 100 nM 程度の濃度で処理するとイネやソルガム、ミヤコグサなど様々な植物の canonical SL の内生量を減少させ、根寄生雑草の発芽を抑制する一方で、イネの分げつには全く影響せず、シロイヌナズナにおいてはやや枝分かれを増加させるものの、そのためには数 μM の濃度で処理する必要がある等植物形態にはほとんど影響を及ぼさない化合物であった。そこで植物形態にも影響を及ぼす新規 SL 生合成阻害剤の探索を行うこととした。

結果

今回は TIS108 をリード化合物とした構造活性相関研究と、ケミカルライブラリーからスクリーニングを行った。TIS108 の構造活性相関研究により、TIS108 の 10 倍程度強力な SL 生合成阻害活性を有する化合物を見出すことができた。また、ケミカルライブラリーよりスクリーニングした結果、新規骨格を有する SL 生合成阻害剤を見出した。現在これらの化合物の植物に対する活性や標的タンパク質の検討を行っており、これらも同時に発表する予定である。

strigolactone, chemical screening, inhibitor

講演番号：2A28a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A28 会場

根寄生雑草 *Striga hermonthica* の多様な KAI2 ホモログの機能分担
Functional analyses of various KAI2 homologs in *Striga hermonthica*
○今村 優作[1]、高橋 郁夫[1]、福井 康佑[1,2]、徐 玉群[1]、宮川 拓也[1]、中村 英光[1]、田之倉 優[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]岡山理科大・理)
○ Yusaku Imamura[1], Ikuo Takahashi[1], Kosuke Fukui[1,2], Yuqun Xu[1], Takuya Miyakawa[1], Hidemitsu Nakamura[1], Masaru Tanokura[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biochemistry, Okayama Univ. of Science)

【背景と目的】
根寄生雑草の一種である *Striga hermonthica* (Sh) は、様々な作物の根に寄生して作物の収量を大きく低下させ、時には全滅させる。*S. hermonthica* の種子は、宿主の根から分泌されるストリゴラクトン (SL) という植物ホルモンを受容することで発芽し、宿主根に寄生する。*S. hermonthica* には、シロイヌナズナ (At) のカリキン受容体である AtKAI2 のホモログが多数存在し、AtKAI2 との保存性が高い順に ShKAI2c、ShKAI2i、ShKAI2d の 3 つのクレードに分けられる。中でも、ShKAI2d クレードは進化の過程で SL を受容できるように変化したと考えられており、*S. hermonthica* の種子を強制的に発芽させて死滅させる「自殺発芽」のターゲットとして注目を集めている。一方、ShKAI2c、ShKAI2i については、ShKAI2i がカリキンと結合することが分かっている他にリガンドや機能に関する情報は得られていない。AtKAI2 と ShKAI2d が種子発芽に関わる因子であることから、その進化の途上に位置する ShKAI2c や ShKAI2i が発芽に関わる可能性も十分考えられる。そこで、ShKAI2c や ShKAI2i が *S. hermonthica* の種子発芽制御の新たな作用点と成り得ると考え、ShKAI2c や ShKAI2i の機能解析を目指した。

【方法と結果】
シロイヌナズナ AtKAI2 は、AtMAX2、シグナル伝達抑制因子 AtSMAX1 と複合体を形成し、AtSMAX1 が分解されてシグナルが伝達される。ShKAI2 と AtSMAX1 との相互作用を酵母 two-hybrid 法を用いて調べたところ、いずれのクレードの ShKAI2 も SL アナログ存在下で相互作用を示した。一方、AtSMAX1 のホモログであり、分げつなどの SL 応答に関わる AtSMXL7 と相互作用を示したのは ShKAI2c だけであった。
また、*S. hermonthica* の種子およびシュート部における *ShKAI2* の遺伝子発現量を調べたところ、*ShKAI2i* は明らかに他と異なる発現傾向を示し、SL への応答性が低いタイミングで発現量が最も高かった。さらに、ShKAI2i と結合することが分かっているカリキンが *S. hermonthica* の種子発芽に及ぼす影響について調べた。その結果、カリキンは高濃度で処理するとわずかに種子発芽を誘導する一方、SL アナログ GR24 と共処理すると種子発芽を阻害した。これらの結果から、ShKAI2i は当初の予想と異なり、発芽を負に制御する可能性が示唆された。

Striga hermonthica, KAI2, seed germination

講演番号：2A28a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A28 会場

常温固体型エチレン様活性物質による農業被害低減効果の追究

Damage control of crop production using solid ethylene mimic compounds

○水野 翼[1]、財前 穂波[1]、鈴木 優志[1]、北畑 信隆[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科、[2]東理大・理)
○Tsubasa Mizuno[1], Honami Zaizen[1], Masashi Suzuki[1], Nobutaka Kitahata[2], Tadao Asami[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. Science)

【背景と目的】

Striga hermonthica（ストライガ)は「魔女の雑草」とも呼ばれる根寄生雑草で、サブサハラアフリカを中心に農作物生産に多大な被害を及ぼしている。本研究では、ストライガ防除を目的として、ストライガ種子の自殺発芽誘導活性をもつエチレンに着目した。ストライガ種子を温暖湿潤な条件下に 1,2 週間さらすコンディショニングという処理を行った後、合成ストリゴラクトンアナログである GR24 を処理すると、エチレン生合成が活性化し、発芽へと向かうことが知られている。アメリカ合衆国では、エチレンを土壌中に注入することで自殺発芽を誘導する手法を用いてトライガ防除に成功しているが、設備が高価であるため、ストライガ被害の中心地であるアフリカでこの手法を適用することは現実的ではない。我々は、シロイヌナズナにおいてエチレン特有の応答であるトリプルレスポンスを引き起こす KUT15 を報告している。KUT15 は白色粉末状の化合物であり、エチレンガスと比較すると扱いが容易である。そこでこのストライガ種子の発芽誘導活性に焦点を当てた追究を行った。KUT15 は予想通りストライガ種子の発芽誘導活性を示す化合物であったため、この化合物をリード化合物として構造展開を行い、ストライガにおける発芽誘導活性を評価することで実用可能性のある化合物の探索を試みた。また、GR24 と KUT15 を共処理し、エチレンおよびストリゴラクトンの両シグナル経路を同時に活性化することによる発芽誘導活性への効果や、エチレン生合成遺伝子の発現量への影響についても解析した。

【方法と結果】

KUT15 は 3 つの置換基をもつトリアゾール誘導体である。今回、KUT15 をリード化合物として 2 つの置換基を改変し、合成した化合物のシロイヌナズナにおけるエチレン様活性と、ストライガ種子発芽誘導活性を調べた。その結果、合成化合物中にエチレン生合成中間体である ACC と同程度のストライガ種子発芽誘導活性をもつ化合物を見出した。また、ストリゴラクトンによるストライガ種子発芽には通常はコンディショニングが必要であるが、GR24 および KUT15 の共処理では、コンディショニングを行わない場合でも、それぞれの化合物単独処理時と比較して発芽誘導活性が高くなる傾向が見られた。これらの結果から、エチレンおよびストリゴラクトンシグナルを活性化する化合物の併用が農業利用という観点から有望であることが示唆された。

Ethylene, *Striga hermonthica*, Strigolactone

講演番号：2A28a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A28 会場

Integration of STH7 and BIL1 Moderate Strigolactone and Brassinosteroid Crosstalk on Light-adapted Development in *Arabidopsis*

○Jutiporn Thussagunpanit[1], Yuko Nagai[1], Takeshi Nakano[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]CSRS, RIKEN)

[Background]

Plant hormones and light signals are coordinately related to photomorphogenesis in plant. Strigolactones (SLs) inhibit *Arabidopsis* hypocotyl elongation which is one of light-adapted response but, brassinosteroids (BRs) stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation. Moreover, SLs up-regulate *STH7* which is the transcription factor belonging to the double B-box zinc finger subfamily and also regulates BR signaling in hypocotyl elongation.

[Methods and Results]

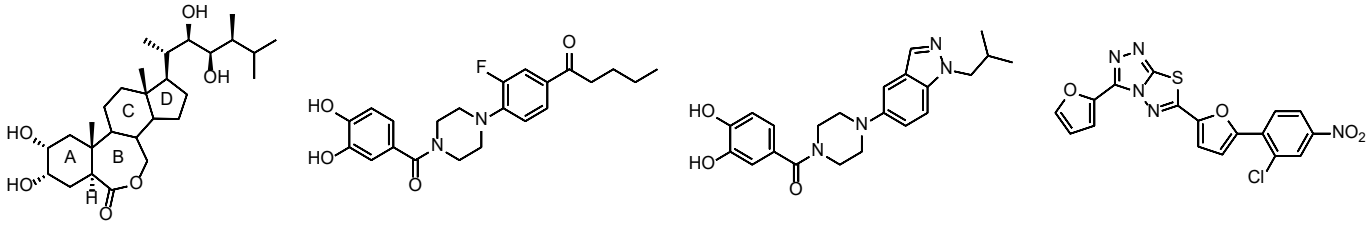
To investigate the function of STH7 in SL and BR crosstalk, we analyzed the genes that moderated by both STH7 and BR treatments from previously published microarray data. In genes overlapping the STH7-upregulated genes and the BR-repressed genes, half of them, including *STH7*, *ELIP2* and *CHI*, were the genes related to the light-adapted development. Quantitative real-time PCR analysis showed that the co-application of the SL analogue, GR24, and the BR biosynthesis inhibitor, brassinazole (Brz), extremely upregulated the transcription level of *STH7*, *ELIP2*, *CHI* and their homologs. To understand the STH7 function, we prepared *STH7-overexpressing* (*STH7ox*) and functionally defective *STH7* (*STH7-SRDX*) mutants. *STH7-SRDX* mutant was insensitive to SL and weakly sensitive to Brz in the inhibition of hypocotyl elongation under weak light condition. Moreover, Brz enhanced the effect of GR24 in the inhibition of hypocotyl elongation in wild-type *Arabidopsis* and *STH7ox*. Next, the double mutant analysis between *STH7ox*, *STH7-SRDX* and the BR gain-of-function *bil1-1D* mutant, were performed to investigate the crosstalk between SL and BR signaling on light-adapted development. The *bil1-1D*×*STH7ox* double mutant exhibited the shortened hypocotyl like *STH7ox*. The results support that STH7 plays the important role in light-adapted development and it works downstream of BIL1, which is a positive regulator of BR signaling.

Photomorphogenesis, Plant hormone crosstalk, Transcription factor

講演番号：2A28a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A28 会場

非ステロイド型ブラシノライド様活性化合物 NSBR1 の構造変換
Modification of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1
○松尾 美登理[1]、青木 孝憲[1]、杉浦 愛理[1]、山上 あゆみ[2]、中野 雄司[2]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]理研 CSRS)
○Midori MATSUO[1], Takanori AOKI[1], Airi SUGIURA[1], Ayumi YAMAGAMI[2], Takeshi NAKANO[2], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]RIKEN CSRS)

【目的】ブラシノライド（BL）を代表とするブラシノステロイド（BR）は，極微量で伸長成長や細胞分裂の促進などの活性を示すことから，植物生長促進剤としての農業利用が期待できる．しかし BR のステロイド構造に由来する高い合成コストが利用の障壁となっている．一方で，昆虫やほ乳類のステロイドホルモンにおいては，それぞれの非ステロイド型アゴニストが農薬，医薬として実用化されており，BR についても非ステロイド化による応用の可能性が期待される．これに関して最近われわれは，インシリコスクリーニングによって非ステロイド型アゴニストを探索し，弱いながらも BL 様活性を示す NSBR1（図 1）を発見することに成功した[1]．また，われわれが発表したのとほぼ同時期に，同じ手法を用いて BL 様活性化合物を発見したという報告がある[2]．本研究においては，さらに BL 様活性の強いアゴニストを探索するため，NSBR1 をリード化合物として構造展開し，それらの活性を評価した．
【方法】OpenEye 社のドッキングソフト FRED を用いて，リード化合物と BL 受容体（PDB:4LSX)の複合体ファイルを作成した．この複合体に対し，AMBER を用いて MD シミュレーションを行った．シミュレーション結果を元にリード化合物の構造展開を行い，受容体との結合自由エネルギー（ΔG）を指標に受容体と強い相互作用を示すと予想される化合物を合成した．活性はイネの第二葉身屈曲試験とシロイヌナズナの胚軸形態観察及び遺伝子発現解析により評価した．
【結果および考察】リード化合物の BL の D 環と側鎖部分に相当する部分の構造展開を行ったところ，結合自由エネルギー（ΔG）の改善が見られた．またシロイヌナズナにおいて BL 様活性を観測することができた．



ブラシノライド(BL)　NSBR1　新たに見つかったアゴニスト　Lei らが見出した化合物

図 1：ブラシノライド（BL）とその非ステロイド型アゴニスト

[1] Sugiura, *et al.*, *J. Pestic. Sci.*, 42, 105(2017) [2] Lei, *et al.*, *Mol. BioSyst.*, 13, 1364(2017)

brassinosteroid, nonsteroidal agonist, brassinolide

発表責任者：中川好秋（naka@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A28a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A28 会場

新規植物成長促進化合物 PPG の生理機能の解明とターゲット候補タンパク質の機能解析
Analysis for physiological function and target protein of PPG as novel compound of promoter for plant growth

○竹野 駿[1,2]、田中 翔太[1,2]、山上 あゆみ[1]、嶋田 勢津子[1]、松井 南[1]、筧 雄介[3]、嶋田 幸久[3]、瀬上 紹嗣[4]、近藤 恭光[1]、堂前 直[1]、久城 哲夫[2]、前島 正義[4]、浅見 忠男[5,6]、長田 裕之[1]、篠崎 一雄[1]、中野 雄司[1,6]（[1]理研・CSRS、[2]明治大院・農芸化学、[3]横浜市大、[4]名大院・生命農、[5]東大院・農生科・応生化、[6]CREST・JST）
○Shun Takeno[1,2], Shota Tanaka[1,2], Ayumi Yamagami[1], setsuko Shimada[1], Minami Matsui[1], Yusuke Kakei[3], Yukihisa Shimada[3], Shouji Segami[4], Yasumitsu Kondo[1], Naoshi Domae[1], Tetsuo Kushiro[2], Masayoshi Maeshima[4], Tadao Asami[5,6], Hiroyuki Osada[1], Kazuo Shinozaki[1], Takeshi Nakano[1,6] ([1]RIKEN ・ CSRS, [2]Dept.Agric.Chem.,Meiji Univ., [3]Yokohama City Univ., [4]Dept.Biol.Agri.Univ., [5]Dept.Appl.Biol.Chem.,Univ.of Tokyo, [6]CREST・JST)

【背景と目的】
新規の植物成長調節剤(PGRs)の探索は、植物における未知の成長メカニズムを解明するための有用なツールとなり得るだけでなく、実用作物への応用にも期待できる。本研究では、植物成長促進活性を示すブラシノステロイド(BR)の情報伝達経路に特異的に作用する化合物の探索を目的とし、アラビドプシス BR 情報伝達活性型変異体の胚軸伸長を指標にして、理化学研究所のケミカルライブラリーNPDepo からケミカルスクリーニングを行なった。その結果、野生型の胚軸伸長は阻害するが、BR 情報伝達活性型変異体では胚軸伸長阻害に対して耐性を示す低分子化合物 FPX が得られた。興味深いことに、FPX 存在下の明所条件では、アラビドプシスだけでなく、イネ、ポプラなどの実用作物においてもカルスの形成が観察された。さらに、FPX は植物体中で CPX と PPG に代謝されること、PPG は濃度依存的にカルス増殖促進活性を示すことが明らかになった。また、PPG 単剤存在下でアラビドプシスを生育させた結果、顕著な成長促進活性を示したことから、PPG のより詳細な生理機能の解明とターゲットタンパク質の探索を試みた。
【結果と考察】
PPG 存在下、明所条件で野生型アラビドプシスを生育させた結果、発芽 28 日目の植物体で葉面積、側根数が 2 倍、花茎数が 1.5 倍増加する成長促進活性を有することが明らかになった。さらにイネ、トマトにおいても PPG は成長促進活性を示した。PPG は既知の PGRs、植物ホルモン種とは全く異なる化学構造を持つこと、他の成長促進型植物ホルモンとは異なり葉の形態を変形させないなどの特性を有していた。PPG の作用機序を明らかにするため、PPG6 時間処理植物体におけるマイクロアレイ解析を行ったところ、植物ホルモン応答性遺伝子の発現変動はほぼ見られず、活性酸素処理応答遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、発生関連遺伝子の応答を解析したところ、WUS、RKD1 などの発現上昇が認められた。このような興味深い性質から、PPG の機能をより具体的に明らかにすることを目指して、ケミカルビーズ法を用いて PPG のターゲットタンパク質の探索を行なった。アガロースビーズにリンカーを介して PPG を結合させた PPG ビーズを作成し、アラビドプシス明所発芽植物体の全タンパク質と混合させることにより、PPG ビーズ特異的に結合するタンパク質を特定した。これら PPG 結合タンパク質候補について理化学研究所の過剰発現変異体 FOX ラインにおいて、PPG 処理植物体同様の葉面積増大形態、マイクロアレイ解析で同定した PPG マーカー遺伝子の候補遺伝子高発現株における発現上昇、候補遺伝子破壊株への PPG 処理時における応答性低下の解析を進めている。また、PPG によるターゲットタンパク質の安定化、または活性化機構についても解析を進めている。

Plant growth regulator, Chemical screening

発表責任者：中野 雄司（t.nakano@riken.jp）

講演番号：2A28a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A28 会場

MD シミュレーションにより明らかとなったイネジベレリン代謝酵素の活性機構

The activation mechanism of GA metabolic enzyme in rice, revealed by MD simulation

○竹原 清日[1]、三上 文三[2]、桜庭 俊[3]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農、[3]東大院・創域）
○Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Shun SAKURABA[3], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tokyo Univ.)

【目的】植物ホルモンのひとつであるジベレリン (GA) は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox) および GA3-oxidase (GA3ox) が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox) が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。 我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA 不活化酵素である GA2ox3 の構造を明らかにした。 全体構造は、S−S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である GA_4 が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して 4 量体を形成していることが明らかとなった。 そこで本研究は、この多量体構造の形成と酵素活性との関係を明らかにすることを目的とした。 また、これら酵素の機能解析も行った。
【方法・結果】GA2ox3 の溶液中での分子状態を調べるため、多量体形成に必要と考えられる GA_4 存在下でゲル濾過を行った。その結果、溶液中でも 4 量体構造をとることが明らかとなった。 さらに、植物細胞内における多量体形成能および細胞内での局在場所を調べるため、イネのプロトプラストを用いた BiFC 解析を行った。 その結果、*in vitro* と同様に *in planta* でも多量体構造をとっており、その多量体形成は細胞質で行われることも分かった。 また、ゲルろ過で 4 量体および単量体の単離にも成功し、得られた各分子の酵素活性を調べたところ、GA_4 を介した 4 量体は単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。 また、GA_4 の有無により可逆的に 4 量体を形成することも明らかになった。以上の結果から、GA2ox3 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、GA_4 濃度が上昇すると多量体構造を形成して活性を上げ、GA 代謝を促進するといった、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆された。
さらに、GA2ox3 の活性機構ついて検討するため、分子動力学シミュレーションによる蛋白質のダイナミクスを解析した。 その結果、活性部位を覆う蓋のようなβシートの開閉や、分子間での相互作用による蓋の安定性が反応速度に寄与することが明らかとなった。
本研究は、新学術領域研究により助成された。

gibberellin, plant hormone, dioxygenase

講演番号：2A28a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A28 会場

イネの DELLA タンパク質の構造解析への試み
Structural analysis of DELLA protein in rice
○杉原 諒彦、竹原 清日、松岡 誠、上口（田中） 美弥子（名大農）
○ Akihiko SUGIHARA, Sayaka TAKEHARA, Makoto MATSUOKA, Miyako UEGUCHI(TANAKA) (Nagoya Univ.)

【目的・背景】
植物ホルモンの一つであるジベレリン（GA）には草丈の伸長や花芽形成の促進、発芽の促進に働く作用がある。GA シグナルで中心的な働きを担う DELLA タンパク質は GA の反応を抑制する因子であり、C 末側に GRAS ドメインを、N 末側に DELLA および TVHYNP モチーフをもつ。 細胞内で GA が受容体 GID1 と結合すると、GA-GID1 複合体は核内で DELLA/TVHYNP モチーフを介して DELLA タンパク質と結合し、26S プロテアソームによって分解され GA 応答が起こる。 これまで、当研究室はシロイヌナズナを用いて C2H2 型 zinc finger をもつ IDD の C 末端側が DELLA の GRAS ドメインと結合し、転写を促進することを明らかにした。 さらに、最近 GRAS ファミリータンパク質である SHORT-ROOT(SHR)と IDD の N 末側が結合し、その共結晶構造が報告された。 しかし、DELLA タンパク質との結合様式や機能に違いがある。 そこで、本研究では X 線結晶構造解析により、イネの DELLA タンパク質である SLR1 と IDD との分子機構や結合様式を明らかにし、GA による転写調節機構をより深く理解することを目的とした。
【方法・結果】
SLR1 の GRAS ドメインと IDD 全長を、それぞれ GST タグを付加し大腸菌系で発現させた。 しかし、IDD は不安定な領域が多く安定性に欠け、全長での発現量がかなり低かった。 そこで、IDD における SLR1 との結合領域のみを使うためプルダウンによって調べた。 その結果、IDD の C 末側の C1 および C2 ドメインを含む領域が SLR1 の GRAS ドメインと結合することが明らかとなった。
さらに IPTG の濃度や温度、培養時間などの培養条件を検討した結果、SLR1、IDD ともに 37℃で 3～4 時間発現させることで、結晶化を試みるに十分量のサンプルを得ることに成功した。 現在は結晶化の初期条件を探索中である。
本研究は新学術領域研究の助成を受けた。

DELLA protein, gibberellin, transcription factor

講演番号：2A28a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A28 会場

原始ジベレリン様成長制御物質の同定

An ancestral gibberellin in a moss

○宮崎 翔[1]、原 万里穂[1]、伊藤 晋作[2]、田中 啓介[3]、松岡 信[4]、浅見 忠男[1]、林 謙一郎[5]、川出 洋[6]、中嶋 正敏[1] ([1]東大院農生科、[2]東農大応生化、[3]東農大ゲノムセンター、[4]名大生物機能センター、[5]岡山理大理、[6]東京農工大院農)

○Sho MIYAZAKI[1], Mariho Hara[1], Shinsaku Ito[2], Keisuke Tanaka[3], Makoto Matsuoka[4], Tadao Asami[1], Ken-ichiro Hayashi[5], Hiroshi Kawaide[6], Masatoshi Nakajima[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agriculture, [4]Nagoya Univ., [5]Okayama Univ. of Sci., [6]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【背景・目的】　種子発芽や伸長に関わるジテルペノイド型植物ホルモン，ジベレリン(GA)がコケ植物に存在する報告はない. しかし, モデルコケ植物であるヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)のゲノム情報を精査すると，GA の生合成に関わる酵素遺伝子が複数存在した．GA を生産しないコケになぜ GA 生合成酵素が保存されているのかに着目し，まず我々はそれら酵素遺伝子の機能解析を行い，*ent*-カウレン合成酵素（PpCPS/KS）および *ent*-カウレン酸化酵素が機能し，顕花植物と同様にゲラニルゲラニル二リン酸から *ent*-カウレン酸(以下，KA)までの GA 生合成過程を保有していることを明らかとした. さらに, KA 代謝産物の生理機能を解析するために作出した *Ppcps/ks* 欠損変異体では，原糸体の分化過程に抑制の傾向が認められ，KA の投与でこの異常形質が回復したのに対し，GA 投与では回復しなかった. このことから, ヒメツリガネゴケ原糸体では GA 生合成が中断される代わりに, KA を中間体に用いて未同定の代謝物が生合成され, 原糸体の分化誘導を制御する可能性が強く示唆された．我々はこのジテルペノイド型成長制御物質の同定および生合成過程の解明を目的として KA 代謝物を追跡しており，本発表では原始 GA とも換言できる KA 代謝産物を同定したので報告する.

【方法・結果】　当該植物材料からメタノール抽出物を調製し, 逆相 HPLC を展開して得た精製画分の生物活性試験を行った結果，KA より高極性の代謝物を含む活性画分を検出した. LC-MS/MS, GC-MS を用いた分析により，活性画分に含まれる化合物は 3 位水酸化 KA であると合成化合物との直接比較から同定した．次に生合成酵素遺伝子の探索を目的として次世代シークエンサを用いたトランスクリプトーム解析を行い，関連候補遺伝子の一つが KA の代謝反応に関わると判明した．この代謝産物を酵素合成し，NMR を用いて 2 位水酸化 KA であると構造決定した．植物体内での生理機能を調べるため，この 2 位水酸化酵素の欠損変異体を作出したところ，原糸体の分化誘導活性が野生株より高い表現型が認められた．2 位水酸化 KA が原糸体分化活性を示さない結果と併せると，KA の 2 位水酸化は不活性化経路上で機能していることが明らかとなった．一方 3 位水酸化 KA は KA より高い原糸体分化活性を示し，3 位水酸化 KA から活性型代謝産物が生産されないことから，KA の 3 位水酸化は生合成経路上の最後の活性化反応であることが示された. 以上の結果から，コケ植物は GA を生合成しない代わりに 3 位水酸化 KA を成長制御物質として利用し，生合成経路における活性制御は GA 生合成経路でも見られる 3 位水酸化による活性化，2 位水酸化による不活性化であることを明らかとした.

gibberellin, Physcomitrella, kaurenoic acid

発表責任者：宮崎翔（sho0707mpgr@gmail.com）

講演番号：2A28a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A28 会場

下等植物から高等植物に至る *ent*-kaurene 合成酵素の機能進化

Evolutional trajectory of the function in *ent*-kaurene synthases of land plants

○福田 和佳子[1]、宮崎 翔[1]、牧野 晴香[1]、木村 穂乃香[1]、貝沼 遼介[1]、安藤 朋子[1]、夏目 雅裕[1]、野崎 浩[2]、林 謙一郎[2]、川出 洋[1] ([1]東京農工大院農、[2]岡山理科大理)
○ Wakako FUKUDA[1], Sho MIYAZAKI[1], Haruka MAKINO[1], Honoka KIMURA[1], Ryosuke KAINUMA[1], Tomoko ANDO[1], Masahiro NATSUME[1], Hiroshi NOZAKI[2], Kenichiro HAYASHI[2], Hiroshi KAWAIDE[1] ([1]Grad.Agric.,Tokyo Univ.Agric.Technol, [2]Dep.Biochem.,Okayama Univ.Sci.)

【目的】

非維管束系陸上植物である蘚類のハイゴケは、イネ科植物で生産するファイトアレキシンの一種、モミラクトン類を生産する。我々の研究室では、ハイゴケのモミラクトン生合成において機能するジテルペン環化酵素 9βH-pimara-7,15-diene 合成酵素 (HpDTC1) の cDNA をクローニングした。またその他に、*ent*-pimara-9(11),15-diene 合成酵素である HpDTC2、高等植物のジベレリンの中間体 *ent*-kaur-16-ene 合成酵素である HpDTC3 の２つの多機能型ジテルペン環化酵素の cDNA のクローニングにも成功した。この HpDTC2 と HpDTC3 のアミノ酸配列の相同性は９０％近くに及び、ハイゴケのゲノム中で機能するジテルペン環化酵素遺伝子としては進化的に非常に近いことを意味している。我々はこのアミノ酸配列において、HpDTC2 と HpDTC3 の生成物の作り分けに関与している二つのアミノ酸残基を特定した。本研究では、原始的なハイゴケの多機能型環化酵素の生成物の決定に関与しているアミノ酸残基が、高等植物の単機能型 *ent*-kaurene 合成酵素においても活性に関与しているのかどうかを調べ、ジテルペン環化反応におけるアミノ酸残基の役割を明らかにすることを目指した。

【方法と結果】

高等植物であるイネの *ent*-kaurene 合成酵素である OsKS1 を用いて、HpDTC2・HpDTC3 の生成物の作り分けに関わっている疎水性アミノ酸残基(A/G、V/I) を点変異導入法によって２か所同時に変異させた酵素、OsKS1(V→A/F→G)を作製した。大腸菌を用いて生産した変異酵素の活性を調べ、生成物を GC-MS で分析した結果から、本来の生成物である *ent*-kaurene ではない化合物が検出された。この化合物は HpDTC2 の生成物である *ent*-pimara-9(11),15-diene とは異なるピマラジエン型ジテルペンと考えられる。現在までの結果から、*ent*-kaurene の合成には酵素の活性部位のアミノ酸残基の側鎖の大きさが重要であり、活性部位の空間が狭まることにより炭素結合が切れて転移反応が引き起こされると推測している。*ent*-kaurene への環化メカニズムにおいてこれらのアミノ酸残基の役割が、下等な非種子植物のコケ植物の多機能型環化酵素から高等な種子植物の単機能型環化酵素まで保存されていることが示唆される。

biosynthesis, cyclase, diterpene

発表責任者：福田和佳子（s171265u@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：2A28p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A28 会場

ゼニゴケ・ゲノムにおける植物ホルモン生合成・シグナル伝達系遺伝子
Genes for plant hormone biosynthesis and signaling in the *Marchantia polymorpha* genome
○山岡 尚平[1]、西浜 竜一[1]、石崎 公庸[2]、大和 勝幸[3]、河内 孝之[1]([1]京大・院・生命科学、[2]神戸大・院・理、[3]近大・生物理工)
○Shohei YAMAOKA[1], Ryuichi NISHIHAMA[1], Kimitsune ISHIZAKI[2], Katsuyuki T. YAMATO[3], Takayuki KOHCHI[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Kobe Univ., [3]BOST, Kindai Univ.)

被子植物からコケ植物まで、全ての陸上植物は、車軸藻類を共通の祖先として進化し、４億７千万年前に陸上に進出した。陸上環境に適応し、多細胞体制を維持し適切な発生・分化を行うために、植物は新規の植物ホルモン生合成・シグナル伝達系を獲得した。我々は最近、国際的な共同研究により、陸上植物進化の最も基部の系統に属する苔類ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)の全ゲノム構造を明らかにし、網羅的な分子系統解析を行った[1)]。その結果、次のことが明らかになった。１）オーキシン：被子植物の生合成・輸送・シグナル伝達因子のホモログを、少ないコピー数だが完全なセットとして持つ[1) 2)]。２）ジャスモン酸(JA)：COI1 受容体、転写調節因子 JAZ および NINJA のホモログを１コピーずつ持つ。また転写因子 MYC2 のホモログは XY 性染色体上に１コピーずつ存在する。しかし生合成については、JA 前駆体である OPDA (12-oxo-phytodienoic acid)まで合成できるが、OPDA reductase を持たないため、JA の代わりに OPDA（またはその代謝物）をホルモンとして使っている可能性がある。３）ジベレリン(GA)：生合成経路は、*ent*-kaurenoic acid oxidase までのホモログを持つが、明確な GA oxidase ホモログを持たず、被子植物の GA とは別の化合物を使っている可能性がある。またシグナル伝達因子については、明確な GID1 受容体のホモログを持たない。４）ストリゴラクトン：シグナル伝達因子ホモログを少ないコピー数だが完全なセットとして持つ。生合成については、カロテノイド開裂酵素 CCD7 ホモログのみを１コピー持っており、被子植物とは異なる経路を持つ可能性がある。５）アブシシン酸：被子植物の生合成・輸送・シグナル伝達因子のホモログを、少ないコピー数でほぼ完全なセットとして持つ。他の多くの植物と異なり、PYL 受容体は５コピー存在する。６）サイトカイニン：生合成・シグナル伝達ともに１ないし２コピーの遺伝子を持つ。７）エチレン：生合成・シグナル伝達ともに１遺伝子のみ持つ。被子植物に見られるエチレン合成酵素 ACO のホモログはない。６)、７）の二成分系は祖先の車軸藻類から存在していたと考えられる。つまり、植物が陸上に進出した時点ですでに植物ホルモンによるシグナル伝達系の基本的な機構は成立しており、ゼニゴケはその原形というべきものを保持していることが示唆された。

1) Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T. et al. (2017) Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 171, 287-304.
2) Kato, H., Nishihama, R., Weijers, D., Kohchi, T. (2017) Evolution of nuclear auxin signaling: lessons from genetic studies with basal land plants. *J Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/erx267.

plant hormone, genome, *Marchantia polymorpha*

発表責任者：河内孝之（tkohchi@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A28p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A28 会場

ゼニゴケで唯一のオーキシン受容体遺伝子 Mp*TIR1* は発生に必要であるが細胞の生存には必須ではない

The sole auxin receptor gene Mp*TIR1* is dispensable for cell survival but required for development in the liverwort *Marchantia polymorpha*

○鈴木 秀政[1]、加藤 大貴[1,2]、山岡 尚平[1]、西浜 竜一[1]、河内 孝之[1] ([1]京大 院 生命、[2]Lab. Biochem., Wageningen Univ.)
○Hidemasa SUZUKI[1], Hirotaka KATO[1,2], Shohei YAMAOKA[1], Ryuichi NISHIHAMA[1], Takayuki KOHCHI[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Lab. Biochem., Wageningen Univ.)

【背景・目的】 植物ホルモンオーキシンは、転写調節を介した信号伝達で多様な生理調節を行う。オーキシンは、受容体タンパク質 TIR1/AFB に結合して転写抑制因子 AUX/IAA の分解を促し、転写因子 ARF による転写調節を亢進させる。オーキシン信号伝達機構は被子植物をモデルに解明されてきたが、機能重複する遺伝子の多さが解析を困難にしていた。実際に、オーキシン受容体遺伝子を全て欠損した変異体の報告例はなく、オーキシン応答が植物成長に必須であるのかは不明である。また、オーキシン信号伝達機構が進化の中でどのように保存または多様化されてきたのか、基部陸上植物でどのような役割を担うのかも興味深い課題である。近年、陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケが、同様のオーキシン信号伝達機構を保持することが示唆されている。本研究では、ゼニゴケゲノムに 1 コピーずつコードされる TIR1/AFB（MpTIR1）と AUX/IAA（MpIAA）に着目し、植物の発生・成長における機能を解析すると共に、オーキシン受容体としての機能を有するか検証した。

【方法・結果】 Mp*TIR1* 生理機能解明のため、機能欠損株（Mp*tir1*^{ko}株）及び Cre-*lox*P による誘導組換え系を用いた誘導欠損株（Mp*tir1*^{CKO}株）を作出し、表現型解析した。Mp*tir1*^{ko}株は、野生型株と同じ培養条件で生育したものの、発芽胞子から正常な葉状体へと成長せず細胞塊状となった。Mp*tir1*^{CKO}株の無性芽を欠損誘導して培養したところ、顕著に矮化し気室孔や杯状体などの器官が形成されなかった。以上の結果から、Mp*TIR1* が発生と分化において重要な働きをすることが示唆された。Mp*TIR1* がオーキシン受容体として機能するか明らかにするため、Mp*TIR1* がオーキシン応答に与える影響及び MpIAA との関係を解析した。外生オーキシンに対して、Mp*TIR1* 過剰発現株は感受性の上昇、Mp*tir1*^{ko}株は耐性を示し、Mp*TIR1* がオーキシン応答を正に制御していることが示唆された。プルダウンアッセイを行ったところ、MpTIR1 は *in vitro* でオーキシン依存的に MpIAA と相互作用した。Mp*tir1*^{CKO}株背景で蛍光タンパク質標識した MpIAA を発現させたところ、Mp*TIR1* 欠損に伴う蛍光強度の上昇が認められ、*in vivo* で MpTIR1 が MpIAA の分解を促進していることが示唆された。以上から、MpTIR1 はオーキシン受容体として機能し MpIAA を標的にすることが示唆された。Mp*tir1*^{ko}株の形態形成やオーキシン応答性は、Mp*TIR1* やシロイヌナズナ *TIR1* の導入により相補された。この結果から、苔類と被子植物で TIR1 の機能が保存されていることが示唆された。本研究により、TIR1/AFB を受容体とするオーキシン信号伝達が陸上植物に広く保存されること、発生や分化において重要な働きを担うものの植物細胞の生存には必須ではないことが示唆された。

auxin signaling, *Marchantia polymorpha*, morphogenesis

講演番号：2A28p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A28 会場

Exploring the physiological functions of gibberellin-related diterpenes in the liverwort *Marchantia polymorpha*

○Rui SUN, Keisuke INOUE, Ryunosuke KUSUNOKI, Ryuichi NISHIHAMA, Shohei YAMAOKA, Takayuki KOHCHI (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

[Background]

The terpene phytohormone gibberellins (GAs) and their chemical homologs participate in broad aspects of plant growth and development. Evolutionarily, the failure to detect endogenous GAs in bryophytes and the lack of functional receptors in the model moss *Physcomitrella patens* suggested acquisition of the hormone after the divergence of vascular plants [*1*, *2*]. However, the analyses of early-step GA biosynthesis enzymes indicated that some unknown GA precursor derivative(s) is required for the protonema differentiation and blue-light avoidance in *P. patens* [*3*, *4*]. In the liverwort *Marchantia polymorpha*, the enzymatic activities of the ent-copalyl diphosphate synthase (CPS) and the ent-kaurene synthase (KS), which catalyze the first steps of the biosynthesis, have been confirmed [*5*]. Yet whether the whole GA biosynthesis pathway exists, or whether GA-related derivatives regulate any developmental processes remains unclear.

[Methods and Results]

We first tried to identify *M. polymorpha* GA biosynthesis genes with phylogenetic analysis. In addition to MpCPS and MpKS, homologs for the ent-kaurene oxidase (KO) and the ent-kaurenoic acid oxidase (KAO) were identified from the genome, but not GA 20-oxidases and GA 3-oxidases. Treatments with KO inhibitors uniconazole or paclobutrazol resulted in abnormalities at different stages of *M. polymorpha* development. Such inhibition could be rescued by downstream intermediates but not the canonical bioactive GAs, suggesting possible existence and physiological function of non-typical bioactive GAs or GA-related terpene derivatives. With further transcriptional and genetic analyses, we are trying to resolve the biology behind this scene.

[1] K. Hirano *et al.*, *Plant Cell.* **19**, 3058–3079 (2007)
[2] Y. Yasumura *et al.*, *Curr. Biol.* **17**, 1225–1230 (2007)
[3] K. Hayashi *et al.*, *Plant Physiol.* **153**, 1085–1097 (2010)
[4] S. Miyazaki *et al.*, *Planta*. **240**, 117–124 (2014)
[5] S. Kumar *et al.*, *Plant Cell.* **28**, 2632–2650 (2016)

Terpene, *Marchantia polymorpha*, Biosynthesis

発表責任者：河内孝之（tkohchi@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A28p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A28 会場

化合物による植物免疫の制御：新規免疫抑制剤 NAS1 の応用を指向した研究

Regulation of plant immunity using new plant immunosuppressive compounds

○青木 智史、姜 凱、徐 銀卿、高橋 郁夫、宮崎 翔、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Satoshi Aoki, Kai Jiang, Eun-Kyung Seo, Ikuo Takahashi, Sho Miyazaki, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem.,Univ of Tokyo)

【背景】

サリチル酸（SA)は植物の病害抵抗に関与する植物ホルモンとして知られ、これまで病害防除や免疫機構の解明に向け、BIT, BTH といった SA シグナルを活性化させるプラントアクティベーターが数多く開発されてきた。一方、アクティベーターとは逆に作用する抑制剤の報告はほとんどなく、数少ない抑制剤の 1 つである PAMD も、植物の生育を阻害する副作用を有していた。植物の免疫抑制剤は免疫機構の解明だけでなく、有益な菌の感染または定着効率を亢進させる農業への応用も期待される。そのため生育阻害は応用に向けた大きな障害となっていたが、昨年の本会にて副作用を除去し、かつ高い SA シグナル抑制活性を有する NAS1 を報告した。NAS1 は SA 酸応答性の *PR* 遺伝子の発現を有意に低減させ、炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)の感染率を増大させたことから、植物免疫抑制剤としての利用が大いに期待されている。そこで本会では、NAS1 の応用に向けた構造活性相関研究と SA シグナル抑制作用機構の解析を行ったので結果について報告する。

【方法と結果】

NAS1 誘導体は o-フェニレンジアミンとシアノ酢酸エチルの縮合反応に続く、カルボン酸誘導体とのカップリング反応によって合成できる。NAS1 構造中のフラン環部分の構造変換に際し、種々のカルボン酸誘導体を用いて NAS1 誘導体を合成した。その結果、フラン環をシクロペンタン環に変換した NAS10 で最も *PR* 遺伝子発現抑制活性が増加し、直鎖アルキルやベンゾフラン環へと変換した誘導体では逆に活性が低減した。また NAS1 の水ならびに DMSO を除く大半の有機溶媒への難溶性の原因として NAS1 構造中のベンゾイミダゾールとβ-ケトニトリルは分子内水素結合を介した 6 員環構造の形成を想定した。そこで環を形成できない NAS1 誘導体をいくつか合成したところ、いずれも溶解性が大きく向上した。一方で、*PR* 遺伝子の発現抑制活性を NAS1 と比較するとその活性が大きく低下する結果となった。

さらに作用機構解析の一環として、病傷害に応答し、SA と拮抗してはたらくことが知られるジャスモン酸シグナルのマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現量を評価したところ、NAS1 処理によってその発現量が低減された。すなわち NAS1 は未知の経路を含む広範な植物免疫経路を対象とする抑制剤として働くことが示唆された。この結果に基づき、さらに詳細な作用解析をアブシジン酸やその他 SA シグナル伝達因子を対象に行ったので併せて報告する。

Salicylic acid, Chemical biology, Plant immunity

講演番号：2A28p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A28 会場

多機能輸送体 NPF2.10 の基質選択制御に関する研究

Regulation of substrate selectivity in multifunctional transporter, NPF2.10

○石丸 泰寛[1]、及川 貴也[1]、竹内 優輔[1]、清水 崇史[2]、瀬尾 光範[2]、上田 実[1] ([1]東北大院理、[2]理研)
○ Yasuhiro ISHIMARU[1], Takaya OIKAWA[1], Yusuke TAKEUCHI[1], Takafumi SHIMIZU[2], Mitsunori SEO[2], Minoru UEDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]RIKEN)

【目的】Nitrate transporter 1/peptide transporter family (NPF) 2.10 は，植物ホルモンであるジベレリン酸やジャスモン酸イソロイシンと，生体防御物質であるグルコシノレートを吸収する多機能輸送体である．NPF2.10 のジベレリン酸輸送は生殖成長期における雄しべの伸長に必須であり，ジャスモン酸イソロイシン輸送は傷害時おける過剰な防御応答の緩和にも関わっている．同時に NPF2.10 は，種子へのグルコシノレート移行や蓄積にも重要な役割を果たしている. このように, 植物体において NPF2.10 は，構造や化学的性質のまったく異なる化合物を厳密に認識し，それぞれ異なった生理現象を誘導する．今回，我々はどのように制御により NPF2.10 がそれぞれの基質を選択しているかを，異種発現系を用いて解析した.

【方法と結果】NPF2.10 と同じ NPF ファミリーに属する NPF6.3 は，リン酸化・脱リン酸化制御下で単量体あるいは二量体によって親和性が制御されている硝酸輸送体である．そこで我々は，NPF2.10 にも NPF6.3 類似した制御機構があるのではないかと考え，BiFC（Bimolecular Fluorescence Complementation）法を用いて NPF2.10 が二量体を形成するかを解析した．アフリカツメガエルの卵母細胞に NPF2.10_vyce と NPF2.10_vyne を発現させたところ，細胞膜上に NPF2.10 の二量体由来の蛍光を観察できた．さらに，NPF2.10_WT，脱リン酸化ミミック NPF2.10_T135A とリン酸化ミミック NPF2.10_T135D を作製し解析したところ，NPF2.10_WT と NPF2.10_T135A では BiFC による蛍光が確認できたのに対し，NPF2.10_T135D では蛍光は確認できなかった．従って NPF2.10 は，NPF6.3 と同様に，リン酸化時には単量体, 脱リン酸化時には二量体として存在することが示唆された. 次に, NPF2.10_WT, NPF2.10_T135A, NPF2.10_T135D のジベレリン酸とグルコシノレートに対する輸送活性を測定した．ジベレリン酸に対する NPF2.10_WT と NPF2.10_T135A のミカエリス定数 K_m は，それぞれ 2.5，5.9 mM であったが，NPF2.10_T135A の輸送活性は確認できなかった．また，グルコシノレートに対する NPF2.10_WT，NPF2.10_T135A，NPF2.10_T135D の K_m は，それぞれ 61，62，27 μM であった．以上から，脱リン酸化状態の NPF2.10 は二量体を形成してジベレリン酸とグルコシノレートを輸送し，リン酸化状態の NPF2.10 は単量体で存在してグルコシノレートのみを輸送するという多基質選択制御機構の一端を明らかにした．現在，NPF2.10 と他の NPF がヘテロ二量体を形成する可能性と，輸送基質の特異性変化への影響について検討を行っている.

transporter, glucosinolate, gibberellic acid

発表責任者：上田実（ueda@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A28p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A28 会場

Theobroxide 処理に伴う植物の病原菌に対する抵抗力への影響
Theobroxide makes plants vulnerable to infection from pathogens.
○長田 憲幸、松浦 英幸、高橋 公咲、増田 税、犬飼 剛、山下 雄大 (北大院農)
○Noriyuki OSADA, Hideyuki MATSUURA, Kosaku TAKAHASHI, Chikara MASUTA, Tsuyoshi INUKAI, Yudai YAMASHITA (Hokkaido Univ.)

【目的】 Theobroxide は植物病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* によって産生される二次代謝産物のひとつであり、様々な生理活性をもつことが報告されている。そのひとつとして、本化合物をシロイヌナズナに処理することによって、植物体内のアブシシン酸(ABA)量が増大し、それに伴って、ジベレリン(GA)の活性型である GA_4 の蓄積が阻害されることが明らかとなっている。植物の病原菌に対する防御応答には、サリチル酸(SA)と ABA といった植物ホルモンが大きく寄与すること、さらに、これらの植物ホルモンは互いに拮抗作用を持つことが知られている。よって、theobroxide による ABA の蓄積は SA シグナル伝達に対して負に作用し、植物の病原菌への抵抗力の低下が引き起こされるのではないか考えられた。本発表では theobroxide 灌水処理に伴う植物の病原菌に対する抵抗力への影響について報告する。
【方法】シロイヌナズナに対して、播種後 33、35、37 日に 0.1 mM theobroxide 水溶液を 1 株あたり 30 mL、計 3 回、灌水処理で根部より植物にあたえた。最終処理日から 2 日後（播種後 41 日）に、蛍光タンパクを導入したカブモザイクウイルス(TuMV) を接種し、経過を観察した。さらに、同様の条件で theobroxide 処理を行ったシロイヌナズナの各植物ホルモンの内生量の変化を、各化合物の重水素ラベル体を内部標準物質として、UPLC-MS/MS を用いて定量・分析を行った。また、シロイヌナズナにおけるウイルス感染の防御応答に関与する遺伝子の発現量を定量 PCR によって発現解析を行った。
【結果】TuMV の感染実験では灌水処理の植物において、より多くの蛍光を有するスポットが観察され、theobroxide 処理によりシロイヌナズナのウイルスに対する防御応答能力が低下することを発見した。また、UPLC-MS/MS による定量から、theobroxide 処理によって植物体内の ABA 量が有意に増大していることが再確認されたが、ジャスモン酸、SA や SA グルコシド(SAG)の内生量には有意な差はなかった。定量 PCR による遺伝子の発現解析から、PR1 遺伝子の発現量の抑制が確認されたが、SA の生合成に関与する遺伝子の発現に差はなかった。
【考察】以上の結果から theobroxide 処理によって植物体内に ABA が蓄積し、SA シグナル伝達経路の下流が阻害されたために、ウィルスの感染が顕著であったことが示唆できた。*L. theobromae* は感染後の菌の蔓延が非常に早いことが知られている。本病原菌は自身の生産する二次代謝産物、theobroxide を介し植物ホルモン同士の拮抗関係を巧みに利用して、植物への感染を有利に進めているのではないかと考えられる。

Abscisic acid, Interaction between plant hormones, Immune response

講演番号：2A28p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A28 会場

ビール酵母由来の細胞壁溶液葉面散布によるバレイショ増収効果
Stimulation of potato tuberization by spraying yeast cell wall extract
○宮脇 寛治[1]、北川 隆徳[2]、柏木 純一[1]、松浦 英幸[1]、高橋 公咲[1]([1]北大農、[2]アサヒバイオサイクル（株））
○Kanji MIYAWAKI[1], Takanori KITAGAWA[2], Junichi KASHIWAGI[1], Hideyuki MATSUURA[1], Kosaku TAKAHASHI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Asahibiocycle Co., Ltd.)

【目的】 酵母の細胞壁は植物病原菌の細胞壁に類似した構造を有している。よって、酵母の細胞壁成分を葉面散布することで植物の防御応答を誘導し、ジャスモン酸(JA)などの蓄積を促すことが期待できる。また、我々は JA 類によるバレイショ塊茎誘導活性を報告している。そこで、酵母の細胞壁成分のバレイショへの葉面散布はバレイショ塊茎の増収につながるのではと想定した。これを証明するために以下の実験を行った。
【方法・結果】圃場を A、B、C の三つの区画に分け、それぞれの区画に無散布用と処理用のバレイショを１０株ずつ植えた。可溶化処理を施したビール酵母由来の細胞壁溶液（CW1）を２００倍に希釈し葉面散布した。葉面散布の回数は地上に葉部が現れた生育初期、開花直前、塊茎収穫予定日の約 3 週間前の 3 回とした。バレイショの収量調査を行ったところ、無散布区と比べて顕著な増収効果が確認できた。(Fig. 2, 3, 4)さらに、バレイショ表皮に含まれる植物ホルモンの分析から、ジャスモン酸(JA, Fig. 1)および 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA, Fig. 1)の含有量が、葉面散布のバレイショ塊茎において有意に上昇していた。また、葉面散布により、地上部葉内の OPDA 含量が有意に上昇していた。以上の実験から前述の想定が支持されたが、来年度、次年度とも引き続き実験を継続し、再現性を確かめる必要がある。

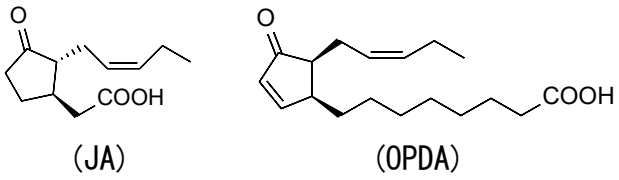


Fig. 1. 今回増加が見られた化合物の立体構造

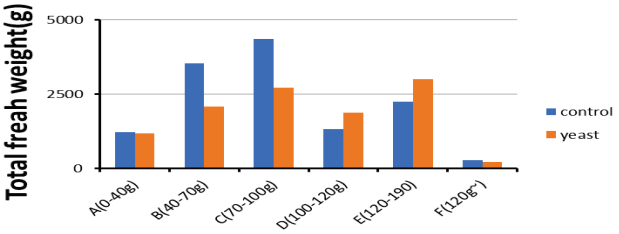


Fig. 2. 区画 A における収量成績

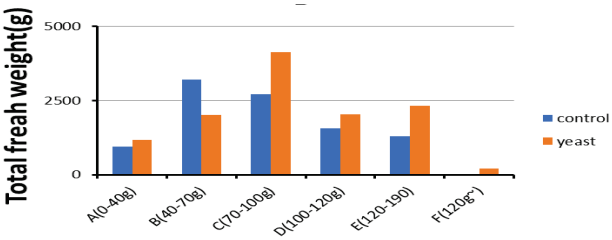


Fig. 3. 区画 B における収量成績

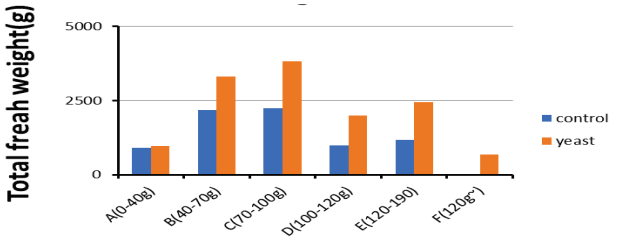


Fig. 4. 区画 C における収量成績

yeast cell wall extract, jasmonic acid, 12-oxo-phytodienoic acid

講演番号：2A28p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A28 会場

イネの３つの COI1 ホモログの機能解析
Functional analysis of three COI1 homologues in rice
○宮本 皓司[1]、稲垣 秀生[1]、伊藤 響[1]、福本 有貴[1]、矢島 彩花[1]、Xi Chen[2]、下里 美由紀[1]、ハセット 絵美[1]、畠山 幸大[1]、平栗 優子[1]、石塚 祐伸[1]、湯本 絵美[1]、柴田 恭美[1]、酒澤 智子[1]、横田 孝雄[1]、岡田 憲典[3]、山根 久和[1] ([1]帝京大・バイオ、[2]ブレーメン大学、[3]東大・生物工学セ)
○Koji MIYAMOTO[1], Hideo INAGAKI[1], Hibiki ITO[1], Yuki FUKUMOTO[1], Ayaka YAJIMA[1], Xi CHEN[2], Miyuki SHIMOSATO[1], Emi HASETT[1], Kodai HATAKEYAMA[1], Yuko HIRAKURI[1], Masanobu ISHITSUKA[1], Emi YUMOTO[1], Kyomi SHIBATA[1], Tomoko SAKAZAWA[1], Takao YOKOTA[1], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[1] ([1]Teikyo Univ., [2]Univ. of Bremen, [3]The Univ. of Tokyo)

ジャスモン酸（JA）は老化、光形態形成や花粉の成熟などの植物の様々な発達過程に関与するとともに、傷害や病虫害などのストレスへの防御応答にも関与する植物ホルモンである。JA の活性型はジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)であることが知られており、COI1-JAZ 複合体が JA-Ile 受容体として機能する。シロイヌナズナにおいては、COI1 をコードする遺伝子は 1 コピーで存在しているのに対して、イネのゲノム中には OsCOI1a, b, c の 3 種の COI1 ホモログがコードされており、それらの生理機能については未解明の状態である。

本研究では、CRISPR-Cas9 法を用いたゲノム編集を行い、*OsCOI1a, b, c* の変異体を作出し、それぞれの変異体の表現型を解析した。まず、播種後 10 日の幼苗の形態を観察したところ、野生型株と比較して *oscoi1c* 変異体の葉は大きく、JA 欠損変異体である *cpm2* と同様の形態であった。また、*oscoi1a* および *oscoi1b* 変異体の稔実率は野生型株と同等であったのに対し、*oscoi1c* 変異体は稔実率が 5%程度であった。これらのことから、幼苗段階での形態形成や花粉の成熟といったイネの発達過程において、OsCOI1c が重要な機能を担っていると考えられる。

次に、JA により誘導されるイネの代表的な防御応答の一つであるファイトアレキシン生産への影響を解析した。1～1.5 ヶ月生育させたそれぞれの変異株の最新展開葉からリーフディスクを作製し、JA 処理 (500μM)を 72 時間行った後、イネの主要なファイトアレキシンであるフラボノイド型のサクラネチン、ジテルペン型のモミラクトン類・ファイトカサン類の蓄積量の解析を行った。その結果、*oscoi1c* 変異体において、これらのファイトアレキシンの蓄積量が野生型と比較して顕著に減少していた。これらのことから JA 処理によるファイトアレキシン生産の誘導においても、OsCOI1c が重要な機能を担っていると考えられた。

また、JA 処理した *oscoi1c* 変異体のリーフディスクでは、野生型と比較して黄化が軽減されており、JA 誘導的な葉の老化にも OsCOI1c が関与していることが示唆された。現在、JA 処理後の各変異株のリーフディスクにおけるクロロフィル含量の定量を行っており、この結果についても報告する予定である。

rice, jasmonic acid, COI1

発表責任者：宮本　皓司（miyamoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：2A28p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A28 会場

蘚類におけるジャスモン酸類の探索と生理活性の追究

Elucidating accumulation and biological function of jasmonates associated with chemical defense in mosses

○照屋 美優[1]、藤原 薫[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、新屋 友規[3]、ガリス イバン[3]、林 謙一郎[4]、宮崎 翔[5]、中嶋 正敏[5]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ、[3]岡山大・植物研、[4]岡山理大・理学部、[5]東大院・農生科)

○ Miyu TERUYA[1], Kaoru FUJIWARA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2], Tomonori SHINYA[3], Ivan GALIS[3], Kenichiro HAYASHI[4], Sho MIYAZAKI[5], Masatoshi NAKAJIMA[5], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]BRC, Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]Okayama Univ., [4]Okayama Univ. of Sci., [5]Agric, Univ. of Tokyo)

【背景】高等植物のイネにおいてジテルペン型ファイトアレキシンの一種であるモミラクトンの生産はジャスモン酸（JA）処理により誘導を受ける［1]。イネ以外のモミラクトン生産植物としては水田雑草のイヌビエのほか進化的に大きく離れた下等植物の蘚類ハイゴケが知られており［2]、これまでに生合成遺伝子として二機能性の初発環化酵素 *syn*-pimara-7,15-diene synthase をコードする *HpDTC1* が同定されている。またハイゴケにおけるモミラクトン生産は、塩化銅処理のような非生物学的ストレスだけでなく病原菌接種などによっても誘導を受ける。しかしイネとは異なり、外生的に与えた JA ではモミラクトン生産も *HpDTC1* 遺伝子の発現も誘導されないのに対して JA 前駆体 12-オキソフィトジエン酸（OPDA）処理による誘導は認められる［3]。さらにハイゴケのメタノール抽出物を LC-MS/MS 分析に供したところ、JA は検出限界以下であった一方で、OPDA が検出されたことを昨年度の本大会で報告した。この結果は蘚類モデル生物ヒメツリガネゴケでも JA が検出限界以下であるいう既知の報告［4] とも一致するが、蘚類において生合成されるオキシリピンの種類やその生理作用については未解明の点が多い。そこで本年度も引き続き蘚類におけるオキシリピンの蓄積を慎重に精査すると共に、生理活性についても検討することにした。

【方法・結果】材料としてハイゴケ茎葉体 0.1 g と 4 種類の蘚類（ヒノキゴケ、ギンゴケ、タマゴケ、シッポゴケ）の茎葉体 0.5 g を分析に用いた。まず、液体窒素による冷却下で植物体を凍結破砕したのちに 40 倍量の 80%メタノール（v/w）を用いて 4℃で一晩抽出を行った。濾過および固相抽出と陰イオン交換による精製の後に、LC-MS/MS での MRM 分析に供した。その結果、ハイゴケ、ヒノキゴケ、シッポゴケにおいては JA が検出限界以下であったが、ギンゴケ、タマゴケにおいて 1.6 ng/g.FW、1.4 ng/g.FW 相当の、JA と保持時間が一致するピークが検出された。一方、JA-Ile と保持時間が一致するピークについては全てのコケでピークが認められたことから、ハイゴケ茎葉体約 4 g を用いて再度分析したところ、0.11 ng/g.FW 相当の、JA と保持時時間が一致するピークが検出された。高等植物と比較して蘚類の JA 蓄積は微量であり、JA アミノ酸複合体に速やかに代謝されることで JA の蓄積が検出されない種が存在する可能性が考えられる。現在、JA の外生投与実験による JA アミノ酸複合体の蓄積量の変化と各化合物のハイゴケにおける生理活性の有無について調べている。

【引用】[1] Riemann *et al.*, 2008. *Plant. J.* [2] Nozaki *et al.*, 2007. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* [3] Okada *et al.*, 2016. *Sci. Rep.* [4] Stumpe *et al.*, 2010. *New. Phytol.*

oxylipin signlaing, chemical defense, jasmonates in mosses

講演番号：2A28p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A28 会場

発達中の小麦種子の植物ホルモンの一斉分析
Simultaneous analysis of plant hormones in developing seeds of wheat
松浦 恭和、○森 泉、平山 隆志（岡山大学植物研）
Takakazu MATSUURA, ○Izumi MORI, Takashi HIRAYAMA (IPSR, Okayama Univ.)

【目的】穂発芽は穂の中で種子が発芽する現象で，イネやオオムギでも時折見られるが，コムギでよく見られる．穂発芽したコムギは低価格で引き取られるため農家の経済的損失は大きい．最近の気象の変化は，今まで穂発芽が見られなかった地域に降雨や高湿度をもたらし穂発芽の頻度を増加させている．コムギの穂発芽感受性とアブシシン酸（ABA）含量の関係については，近年に至っても論争がある．また，ABA 以外のホルモンの定量の報告が少なく詳細は不明である．本研究では，穂発芽感受性の異なる 7 つのコムギ品種における 9 つの植物ホルモンの一斉定量分析をすることで，穂発芽感受性の品種間差における植物ホルモン含量の寄与を確かめた．

【方法】2008 年から 2012 年にわたり，圃場で育てたコムギ 7 品種(Halberd, Chinese Spring, AUS1408, 北系-1354，タマイズミ，ゼンコウジコムギ，OW104）の種子を開花後日数ごとに採取し，それぞれの種子の含水率が 20%を下回ったところで， 15℃および 20℃における発芽指数(GI)調査と 9 つのホルモンの全粒含量(ジベレリン A_1，ジベレリン A_4，インドール酢酸，ABA，ジャスモン酸，ジャスモノイルイソロイシン，サリチル酸，トランスゼアチン，ジヒドロゼアチン，イソペンテニルアデニン)の LC-MS/MS による定量分析を行った．さらに，種子発芽の ABA 感受性を GI により評価した．

【結果と考察】15℃においても 20℃においても品種間に大きな GI の違いが見られ，休眠性に品種間差があることが示唆された．種子内の各ホルモン含量は開花後に種子が成熟するにつれて特徴的な変化を示した．インドール酢酸を除いて各ホルモン含量は GI と明確な相関は見られなかった．主成分解析の結果，各品種間に特徴的なホルモンプロファイルは認められなかった．インドール酢酸含量と GI の間の正の相関は、穂発芽感受性の品種は圃場において既に穂発芽を開始していることを示唆しているのかもしれない．ABA を含め他のホルモン含量は穂発芽感受性と関連しないと考えられた．一方，半切種子の ABA 感受性と全粒種子の GI の間には負の相関が認められた．これらのことはコムギの栽培品種における穂発芽感受性の品種間差はホルモン含量ではなく，他の要因，おそらく ABA 感受性の違い，によることを示唆している．

preharvest sprouting, wheat, plant hormone

発表責任者：森　泉（imori@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A28p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A28 会場

ベタシアニンを生産するクルメケイトウ培養細胞の超低温保存

Cryopreservation of Celosia cristata cultured cells producing betacyanin

○三國 智葉、茂木 智浩、栗山 昭（東電大院理工）
○Tomoyo MIKUNI, Tomohiro MOTEKI, Akira KURIYAMA (Tokyo Denki Univ.)

緒論

植物培養細胞を遺伝子資源とみなし、超低温保存をすることが様々な種で試みられている。超低温保存に用いられる材料は多芽体や茎頂などが用いられることが多い。なぜなら、超低温保存した材料から植物体を再生することを重要視した場合、長期間の継代により分化能を失ってしまうものが多い培養細胞よりも多芽体や茎頂が適しているためである。一方で植物体再性能を失っていても生理的な特徴を持った培養細胞は超低温保存する意味がある。本研究では抗酸化作用を持つ機能性成分ベタシアニン生産能が高いカルス（クルメケイトウ *Celosia cristata*）の超低温保存法の確立を試みた。

材料及び方法

クルメケイトウカルスは無菌的に発芽させた幼植物より得た。すなわち、幼植物の下胚軸切片を 3%ショ糖、10μM BA、0.1μM 2,4-D を含む MS 培地で培養しカルス誘導を行い、その後同培地で継代培養した。発生したカルスは一部で赤色の発色が見られたため、赤色の部分を切り分けて同培地で継代を続けると、それぞれ赤色細胞、白色細胞のみが増殖した。

予備凍結法による超低温保存はイネカルスを保存する実験法 1)に従った。カルスの生死判別は、再培養 28 日目にコロニー形成の有無を確認した。

結果及び考察

クルメケイトウカルスを予備凍結法により超低温保存すると、再培養後にコロニーの形成が確認され、白色細胞では高いコロニー形成率が得られた。しかし、赤色細胞のコロニー形成率は非常に低い。ベタシアニン生産能が高い赤色細胞は、コロニー形成率は低いものの予備凍結法による超低温保存の可能性は示されたため、材料の最適化、凍結・融解条件、再培養条件などを検討することにより超低温保存法の確立はできると考えられる。

1) Plant Science 64, 231-235 (1989)

cryopreservation, Celosia cristata, betacyanin

講演番号：2A28p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A28 会場

イネ培養細胞が生産する生理活性物質

Physiologically active substance produced from cultured rice cells

○福島 亮、栗山 昭（東電大院理工）
○Ryo FUKUSHIMA, Akira KURIYAMA (Tokyo Denki Univ.)

緒論

分裂・増殖させるのが困難な細胞や組織を培養する際、ナース細胞を用いることがある。ナース細胞から何らかの生理活性物質が生産され、それが細胞や組織の分裂・増殖を促進しているのである。イネプロトプラストの培養においてもナース細胞を用い分裂率を高めることはすでに報告されている。ナース細胞から放出される生理活性物質は、プロトプラストの分裂を促進する以外にも生理的に何らかの効果を示すことが期待できる。我々が培養しているイネ懸濁培養細胞から単離したプロトプラストは、通常の方法で培養しても分裂はしなかった。そこで、ナース細胞を用いプロトプラストを分裂させることを試みた。

材料及び方法

イネ(*Oryza sativa* cv. Asanohikari)懸濁培養細胞系は、種子の胚より誘導したカルスから確立した。プロトプラストは 0.1 μM 2.4-D を含む MS 液体培地で 2 週間毎に継代培養している懸濁培養細胞から単離した。プロトプラストの収率は、血球計算盤を用いて算出した。得られたプロトプラストは、0.8% 寒天を含む固形培地中に包埋し、上記の継代培地中で振盪培養を行った。この際、ナース細胞によるプロトプラストの増殖への影響を検討するため、継代培地にナース細胞を添加した区と、添加しない対照区を設定した。プロトプラストの分裂率は、培養開始から数日毎に確認した。

結果及び考察

プロトプラストの単離は、1% セルラーゼ RS、0.1% ペクトリアーゼ Y-23 を含む酵素液で、27℃、3 時間処理することで得られた。プロトプラストの培養における分裂を、ナース細胞の添加の有無により比較した結果、ナース細胞を添加した区ではプロトプラストの分裂は確認された。一方、添加しない対照区では分裂は全く確認できなかった。従って、今回用いたイネ品種においても増殖中の細胞から生産される何らかの物質がプロトプラストの分裂を誘発することがわかった。この生理活性物質が、他の現象に対しても効果を示すか検討中である。

Oriza sativa, Physiologically active substance, Protoplast

講演番号：2A28p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A28 会場

植物の色み改変能を持つ膜輸送体の探索
Search for membrane transporters that have function to change the color of plants
○永縄 万由子、木村 ゆり、武村 みどり、佐古 建志、前島 正義、中西 洋一 (名古屋大院・生命農)
○ Mayuko NAGANAWA, Yuri KIMURA, Midori TAKEMURA, Takeshi SAKO, Masayoshi MAESHIMA, Yoichi NAKANISHI (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

植物色素のアントシアニンは、赤から青系の色みを示し、花や果実における色みの調節に関わっている。アントシアニンは液胞に蓄積するが、色素自体の分子構造に加え、pH や金属イオン濃度、助色素濃度など、液胞内環境の影響によっても色を変える性質を持つ。このため、液胞膜輸送体の活性の有無が発色変化の要因となる。そこで、植物の色みと液胞成分の組成を変える能力を持つ新規膜輸送体の発見を目指した。具体的には、アントシアニンを過剰に蓄積して赤紫色を示すシロイヌナズナの変異株 *pap1-D* に膜輸送体遺伝子コレクション Amethyst を形質転換したライブラリより、親株と色調の異なる株のスクリーニングを進め、候補株を 19 系統得た。

本研究では、候補株で過剰発現している Amethyst 遺伝子と色み形質の関連性を証明するため、スクリーニングで得た株とは独立の形質転換株を再作出し、色みの再現性を調べるとともに葉の吸収スペクトルを解析した。作製した形質転換株のうち、6 種類の遺伝子の過剰発現株ではスペクトルのピークが長波長側に移動し、見た目でも青紫の色みが再現したため、シロイヌナズナのアントシアニンを青くする機能を持つことが確認できた。このうち 3 種類の遺伝子は類似のタンパク質をコードするため、輸送基質とそれに関わる発色メカニズムの関連性が予想される。一方で、赤レタスのプロトプラストで候補の膜輸送体遺伝子を一過的に過剰発現させた実験でも、6 種類の遺伝子がレタスのアントシアニンの青みに関わっていることを示した。双方の結果は一部で重複し、一部は異なっていた。効果の違いの原因として、宿主植物に含まれるアントシアニン色素の構造や濃度、組成、助色素成分の影響が考えられたため、薄層クロマトグラフィーを用いて色素の分析を行った。また、候補輸送体の細胞内での作用機構を明らかにするため、膜輸送体と GFP との融合タンパク質の蛍光観察を行い、局在場所を調べた。その結果、候補分子の 1 つが液胞膜に局在することが明らかになった。その他の輸送体はドット状のオルガネラへの局在が観察された。以上の結果から、各輸送体の分子機能とアントシアニンの色改変の仕組みを考察した。

transporter, anthocyanin, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：2A28p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A28 会場

ピロリン酸が植物の形態形成と成長に与える影響の分子生物学的解析
Accumulation of pyrophosphate causes growth defect of Arabidopsis grown on ammonia-free culture medium

○福田 茉由[1]、瀬上 紹嗣[1]、Ferjani Ali[2]、前島 正義[1] ([1]名大生命農、[2]東京学芸大教育)
○Mayu FUKUDA[1], Shoji SEGAMI[1], Ali Ferjani[2], Masayoshi MAESHIMA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Gakugei Univ.)

【背景と目的】 植物の液胞膜に局在する H^+-pyrophosphatase (H^+-PPase) は、ピロリン酸 (PPi) の加水分解と H^+ポンプの 2 つの機能を合わせもつ。PPi は DNA や RNA、タンパク質、多糖などの合成反応の副産物であり、細胞内に過剰に蓄積すると、これらの高分子合成の反応を化学平衡論的理由により抑制する。したがって、その適切な濃度の維持は細胞にとって必須である。しかし、H^+-PPase 遺伝子を欠損したシロイヌナズナ (*fugu5*) では、発芽以降のステージにおけるわずかな生育の遅延 (Asaoka et al. 2016) およびショ糖無添加培地 (PPi 蓄積の影響が大きく出る条件) における子葉のわずかな形態変化 (Ferjani et al. 2011) 以外には表現型の報告がない。H^+-PPase は液胞膜タンパク質重量の 10%を占めるほど多量に存在する酵素であり、欠損による生育への影響は大きいと予想されたが、実際には、*fugu5* 株のショ糖存在下での発芽以降の生育は比較的良好である。そこで、本研究では、変異株 *fugu5* がより顕著な表現型を示す実験条件を検討すると共に、PPi 濃度と植物の生育との関係ならびにその調節機構の解明を大きな目的とした。
【実験方法と結果】 様々な条件で *fugu5* 株を生育させたところ、顕著な表現型が生ずる条件を見出した。すなわち、窒素源が硝酸イオンのみの培地（MGRL 培地）で生育させた場合に、*fugu5* 株の生育が野生株と比較して強く抑制されることを発見した。この株の本葉を詳細に観察すると、葉脈の形成不全や細胞層の乱れ、メリステム領域の細胞の壊死などが確認できた。さらに、表皮細胞の形状の変化や、表皮細胞表面のクチクラ層にも一部欠損が生じていることが判明した。表現型を示す植物組織は PPi 濃度が高いことも明らかにした。そして、これらの形態異常は、*fugu5* に酵母の可溶性 PPase (IPP1) を導入した場合には観察されなかったことから、*fugu5* 株における一連の形態異常は、H^+-PPase の欠損による PPi の高蓄積によって引き起こされたと考えられる。本研究ではさらに、*fugu5* で観察された一連の形態異常は、生育培地に 1 mM 以上のアンモニアを添加することによって抑制できることを見出した。これらの知見をもとに、細胞内の PPi の蓄積と植物の形態形成、そして窒素源、窒素代謝との関連について考察する。

Pyrophosphate, Growth defect, Nitrogen source

発表責任者：福田茉由（fukuda.mayu@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A28p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A28 会場

葉緑体チラコイド膜に存在する新奇拡散チャネル TPOR の発見

Thylakoid membranes contain porin-like non-specific diffusion channel

○児島 征司[1,2]、栃木 佐枝子[2]、高橋 秀幸[2] ([1]東北大・学際研、[2]東北大院・生命)
○ Seiji KOJIMA[1,2], Saeko TOCHIGI[2], Hideyuki TAKAHASHI[2] ([1]FRIS, Tohoku University, [2]Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

【背景・目的】葉緑体の起源は原始真核細胞に細胞内共生した藍藻である。「微生物の機能を利用する」という点において、植物は史上最も成功した生物の一つと言える。我々は、藍藻が葉緑体へと変貌する過程で、表層膜の物質透過機構がどのように作り変えられたかを明らかにすることを目的として、最も原始的な葉緑体の一つとされる灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の葉緑体（cyanelle と呼ばれる）の表層膜機能の分子機構を研究してきた。これまでに、cyanelle の外膜に Planctomycetes 門細菌の表層蛋白質と類似する拡散チャネル CppS/F が主要蛋白質として存在することを発見し、葉緑体成立過程で外膜機能の大きな変換があったことを示唆してきた。加えて当研究過程で、チラコイド膜から拡散チャネル活性が検出されることを偶然に発見した。本研究では①*C. paradoxa* 以外の光合成生物種に同様のチャネル活性が認められるかどうか、②本チャネル活性を担う蛋白質とその詳細機能は何か、の 2 点について究明した。
【方法・結果】①シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 およびホウレンソウ *Spinacia oleracea* のチラコイド膜を単離しリポソームに再構成して拡散チャネル活性を解析した。その結果 Cyanelle のものと同様の活性が検出され、チラコイド膜における拡散チャネルの存在の普遍性が示唆された。一方、推定チャネル孔半径と蛋白質量あたりのチャネル比活性についてはそれぞれ 1.2 nm ~ 3 nm 及び 10 ~ 50 OD400/min/mg（OD400/min はチャネル活性の指標）と差が認められ、分子的実体の共通性に関しては疑問を残した。②本チャネル蛋白質の精製・同定は、最も高い比活性を持つ cyanelle 由来のチャネルを対象として行った。Cyanelle チラコイド膜を可溶化しゲルろ過及びイオン交換 HPLC に供してチャネル蛋白質を精製した。本精製標品を用いて機能解析した結果、分子量約 600 以下の化合物を非特異的に透過させる働きを持つことがわかった。この性質はグラム陰性細菌に広く存在する Porin と類似することから、本蛋白質を Thylakoidal Porin (TPOR)と名付けた。TPOR 蛋白質を TOF-MS/MS により同定し、全長 cDNA 配列を決定した。TPOR は植物全般に保存され、ミトコンドリア外膜チャネル VDAC と弱い類似性（25 ~ 30% identity）を示す推定 β-barrel 型蛋白質であった。シアノバクテリアには相同遺伝子は保存されていなかった。VDAC のチャネル活性は膜電位依存性を示すことが知られているが、TPOR の電位依存性は認められなかった。チラコイド膜における拡散チャネルの存在は 1998 年のエンドウ葉緑体チラコイド膜のパッチクランプ測定により示唆されていたが、分子的実体は現在まで不明であり、チラコイド膜拡散チャネルの同定例としては本研究が初となった。

channel, thylakoid membrane, chloroplast

発表責任者：児島征司（skojima0801@gmail.com）

講演番号：2A28p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A28 会場

常温性と好熱性シアノバクテリア間のサブユニットスワップ型 RuBisCO の解析

Enzymatic properties of hybrid RuBisCO enzymes with exchanging subunits between mesophilic and thermophilic cyanobacteria.

○磯野 香奈子、蘆田 弘樹（神戸大・人間発達環境）
○Kanako ISONO, Hiroki ASHIDA (Kobe Univ.)

リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RuBisCO）は、光合成カルビンサイクルにおいて CO_2 固定反応を触媒する光合成鍵酵素である。RuBisCO の CO_2/O_2 反応比特異性係数（CO_2/O_2 relative specificity, S_{rel}）は CO_2 識別能力を評価する重要なパラメーターで、紅色非硫黄細菌 *Rhodospirillum rubrum* で 12、常温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 で 45、C3 型植物 *Spinacia oleracea* で 94、 紅藻 *Galdieria partita* で 238 と生物種によって大きく異なる。しかし、その多様性をもたらす要因は、これまで明らかにされていない。

シアノバクテリア RuBisCO は、高等植物や緑藻と同様の触媒サブユニットであるラージサブユニット (LS) 8 個で構成される LS8 コアに、スモールサブユニット (SS)が 8 個会合して形成される LS8SS8 の 16 量体構造を採る。興味深いことに、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の RuBisCO は、常温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の RuBisCO とアミノ酸配列の相同性が高いにも拘わらず、その酵素学的特性が異なり、*T. elongatus* RuBisCO は、*S. elongatus* RuBisCO と比較して、S_{rel}、CO_2 親和性、熱安定性が高い。そこで、シアノバクテリア RuBisCO の酵素学的特性の違いを生み出すメカニズムを解明することを目的に研究を行った。

常温性と好熱性シアノバクテリア RuBisCO の酵素学的特性の違いを引き起こす原因がどちらのサブユニットに深く関係しているのかを明らかにするために、*T. elongatus* と *S. elongatus* RuBisCO 間で SS を入れ換えた 2 種のスワップ型 RuBisCO と両野生型 RuBisCO を用いて構造活性相関解析を行った。解析には、大腸菌で発現させ、精製したリコンビナントタンパク質を用いた。

これらの酵素において S_{rel} と熱安定性を測定した結果、好熱性 *T. elongatus* RuBisCO は 58.7 の S_{rel} を示し、常温性 *S. elongatus* RuBisCO の 40.9 に比べ 1.6 倍高く、*S. elongatus* RuBisCO が失活した 70℃で 85 %の活性を保持していた。スワップ型 RuBisCO において、*S. elongatus* の RuBisCO は *T. elongatus* SS への置換により、野生型よりも S_{rel} が 19 %上昇し、熱安定性も高くなった。また、*T. elongatus* RuBisCO は *S. elongatus* SS への置換により、野生型よりも S_{rel} が 9 %低下し、熱安定性も低下した。これらのことから、S_{rel} と熱安定性の決定には、両サブユニットが関与していることが明らかになった。これまで触媒部位を持たない SS の機能的役割は未知であったが、シアノバクテリア RuBisCO において、SS が RuBisCO 酵素特性の多様化を引き起こす一つの要因であると示唆された。現在、他の酵素学的パラメーターについて解析を行っており、その結果を合わせて報告する。

RuBisCO, photosynthesis, cyanobacteria

講演番号：2A28p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A28 会場

窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* におけるトランスポゾン変異導入系の確立と窒素固定的生育に異常を示す変異株の単離
Transposon mutagenesis and isolation of mutants showing abnormal diazotrophic growth of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*

○戸松 千映[1]、上坂 一馬[2]、山川 壽伯[1]、土屋 徹[3,4]、井原 邦夫[2]、藤田 祐一[1]（[1]名古屋大院生命農、[2]名古屋大遺伝子実験施設、[3]京都大学院人間環境、[4]京都大学院地球環境）
○Chie TOMATSU[1], Kazuma UESAKA[2], Hisanori YAMAKAWA[1], Tohru TSUCHIYA[3,4], Kunio IHARA[2], Yuichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Bioagricultural Sci., Nagoya Univ., [2]Center for Gene Research, Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Human and Environmental Studies, Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. Global Environmental Studies, Kyoto Univ.)

窒素固定反応を担う酵素ニトロゲナーゼは、ATP と還元力を使って分子状窒素（N_2）をアンモニア（NH_3）に変換する反応を触媒する。ニトロゲナーゼを発現させることで、窒素固定能を有する作物が作出できれば、工業的窒素固定でつくられる窒素肥料に強く依存する現在の農業を大きく変革できる可能性がある。しかし、ニトロゲナーゼが酸素に対して極めて脆弱であることが、この一大事業に対し大きな障壁として立ちはだかっている。シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物であり、その多くが窒素固定能を有する。窒素固定性シアノバクテリアは、酸素に脆弱な窒素固定と酸素を発生する光合成を両立させる唯一の生物群であり、日中に光合成、夜間に窒素固定を行うことで両過程を時間的に分離する種や、窒素固定に特化した細胞（ヘテロシスト）を分化させることで両過程を空間的に分離する種が知られている。*Leptolyngbya boryana* は、ヘテロシストを形成しない糸状性シアノバクテリアの一種で、特定の遺伝子の欠損変異株を単離するための形質転換系が確立されており、窒素固定と光合成の両立分子機構を解析するための格好のモデルシアノバクテリアである。今回、*L. boryana* において順遺伝学的研究を展開するために、*in vivo* トランスポゾンタギングによる変異導入系の確立を試みた。別のシアノバクテリアでの利用実績があるトランスポゾンベクター pKUT-Tn*5*-Sm/Sp を、接合により *L. boryana* に導入し、ストレプトマイシン耐性（Sm^R）によりトランスポゾン挿入変異株を単離した。得られた Sm^R 株について、次世代シーケンサーを利用して挿入部位の同定を行ったところ、ゲノムの多様な部位にトランスポゾンが挿入されていることが確認された。この系を利用して約 1800 株の変異株について、窒素固定条件（嫌気条件/硝酸イオン無添加）でスクリーニングを行ったところ、窒素固定条件で生育不可もしくは生育不良を示す株が 2 株、窒素固定条件で生育が促進される株が 1 株単離された。今回は、単離された生育変異株のトランスポゾン挿入部位およびニトロゲナーゼ活性測定の結果をもとに、*L. boryana* で窒素固定条件での生育に必要な遺伝子について考察する。

nitrogen fixation, cyanobacteria, transposon

発表責任者：藤田祐一（fujita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A28p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A28 会場

Plant growth promoting effects of a single Rhodopseudomonas palustris inoculant

Shu-Hwa Hsu, Meng-wei Shen, Kai-Juen Lo, Huu-Sheng Lur, ○Chi-Te Liu (Nat Taiwan Univ.)

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can improve soil quality, enhance plant nutrition availability and uptake, and support the health of plants. Application of PGPR as biofertilizer for the benefits of agriculture has been regarded as an environmental friendly approach to reduce the negative environmental impacts caused by agricultural chemicals. *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3 is a purple non-sulfur phototrophic bacterium, which was isolated from Taiwanese paddy soil. This bacterium was applied in either field or hydroponic cultivation system, such as plant factory, and found that it can not only exert beneficial effects on plant growth, but also enhance use efficiency of applied fertilizer nutrients. the efficiency of nitrogen uptake and utilization (NUpE and NUtE, respectively) and photosynthetic capacity of Chinese cabbage (*Brassica rapa chinensis* L.) was assessed to elucidate the mode of action of the beneficial effects induced by PS3. The N uptake efficiency was around 40% increase in comparison with that in the control group. On the other hand, the plants inoculated with PS3 showed higher photosynthetic capacity in the early stage of plants, then the leave sizes and total C amounts in shoot were increased. Furthermore, we found that the leaves inoculated with PS3 showed high levels of Indole-3-acetic acid (IAA). We deduced that PS3 improves both N and C metabolic efficiencies of plants through plant-microbe interaction, as a result of higher biomass accumulation.

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), nitrogen uptake efficiency, phototroph

講演番号：2A28p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A28 会場

水耕栽培用リン酸塩肥料の自動管理システムの設計と構築

Design of an automatic control system of phosphate fertilizer for hydeoponics

○徐 克彬、白井 理、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Kebin Xu, Osamu Shirai, Yuki Kitazumi, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

気候や気象に左右されず、虫害や病原菌の影響も受けにくい水耕栽培は、野菜の安定供給を念頭に置いた植物工場における必須技術として期待されている。但し、通常の農産物より割高になってしまうことが課題となっている。その実現のため、品質の向上や栽培期間の短縮を目的として温度、湿度、照射光の波長や照射時間の制御など培養条件の最適化だけではなく、肥料成分の濃度管理が求められている。そこで、培養液中の各肥料成分の濃度をモニタリングし、最適条件に制御することが必要不可欠であると考えられる。

リンは窒素、カリウムと共に植物の生育において必要とされる三大要素のひとつであり、自然界では主にリン酸イオンとして存在している。従来より、培養液中のリン酸イオン濃度は定期的に培養液を採取し、分光法あるいはイオンクロマトグラフィーにより定量されてきた。しかしながら、どちらの手法も、試料の前処理が必要であり、その場分析が困難である。一方、イオン選択性電極は、前処理を要せずに長時間の連続測定が可能であり、濃度管理に最適な手法であると思われる。しかし、リン酸イオン選択性電極は安定性などの問題から、これまで実用化されていなかった。

本研究では、リン酸イオン選択性電極としてコバルトの表面にリン酸化合物 $[Co_3(PO_4)_2{\cdot}8H_2O]$ を電析によって固定化した電極を作製した。この電極は pH 4 から 7 の範囲において有効に働き、リン酸イオン濃度が 10^{-5} M から 10^{-1} M の濃度範囲において傾き $-39\ \mathrm{mV\ dec^{-1}}$ の線形応答を示した。電極上では $3Co_3(PO_4)_2 + 6H_2O + O_2 = 3Co(H_2PO_4)_2 + 2Co_3O_4$ で示す反応が生じていると考えられ、Co 金属の溶解・析出、Co 酸化物生成や酸素の還元などの複数反応の混成電位ではあるが、酸素濃度が一定であれば、$H_2PO_4^-$ 活量に感応することが判明した。また，作成した電極は 4 週間以上安定であった．

作製したリン酸イオン選択性電極を利用して培養液中のリン酸イオン濃度を自動的に一定に保持する植物肥料管理システム (イオンスタット) の構築について検討した。イオンスタットは、作製したイオン選択性電極の応答に基づいて培養液中のリン酸濃度をモニタリングし、リン酸濃度が閾値以下になると高濃度のリン酸水溶液を自動的に添加するようにした。実際の水耕栽培において、植物の吸収により培養液中のリン酸イオン濃度が設定した閾値まで下がると、肥料溶液が添加され、培養液中のリン酸イオン濃度が設定した値に制御できることを確認した。

phosphate fertilizer, automatic control, ion selective electrode

発表責任者：徐　克彬（xu.kebin.74s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A29a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟北 A29 会場

生物の代謝産物として植物で初めて見つかったリボフラビン（ビタミン B2）誘導体（第 2 報）
Identification of riboflavin derivatives from plant and its distribution in Cucurbitaceae and Solanaceae.

○金子 元優[1]、佐藤 純一[1]、越野 広雪[2]、田中 啓介[8]、久保田 恵理[8]、大竹 留未[8]、関野 滉太[1]、石井 達也[1]、関 貴公[1]、土岡 美穂[1]、吉澤 夏美[1]、堀江 結衣[1]、武田 晃治[4]、勝田 亮[3]、吉村 悦郎[5]、志波 優[7]、新町 文絵[6]、川崎 信治[1]、額田 恭郎[3]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]理研 CSRS、[3]東京農大・分子生命化学、[4]東京農大・教職、[5]放送大・教養、[6]日大短大・生物資源、[7]東京農大・分子微生物、[8]東京農大・ゲノム解析セ)

○ Motohiro KANEKO[1], Junichi SATOH[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Keisuke TANAKA[8], Emi KUBOTA[8], Rumi OOTAKE[8], Kouta SEKINO[1], Tatsuya ISHII[1], Takamasa SEKI[1], Miho TSHUTIOKA[1], Natsumi YOSHIZAWA[1], Yui HORIE[1], Kouji TAKEDA[4], Ryo KATSUTA[3], Etsurou YOSHIMURA[5], Yuu SHIBA[7], Fumie SHINMACHI[6], Shinji KAWASAKI[1], Tomoo NUKADA[3], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric, [2]RIKEN CSRS, [3]Dept. of Molecular life chemistry, Tokyo Univ. of Agric, [4]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric, [5]School of Graduate Studies, Open Univ. of Japan, [6]Dept. of Bioresource Science, Junior College, Nihon University, [7]Dept. of Molecular microbe, Tokyo Univ. of Agric, [8]NODAI Genome Reseach Center)

【背景・目的】光合成生物である数種の双子葉植物では鉄欠乏条件下で根の細胞外にフラビン化合物を分泌することが知られている。数種の双子葉植物を鉄欠乏条件下で栽培すると、ウリ科のキュウリが最も多くフラビン化合物を分泌することが見いだされている(新町ら 1994)。そこで我々はキュウリ水耕液を鉄十分条件下、鉄欠乏条件下でHPLC分析にて比較したところ、鉄欠乏条件下の水耕液からRfと共にRfとは異なる新たな未知化合物のピークを検出し、これを4’-keto riboflavin（4’-ketoRf）と同定し[1)]、ウリ科での分布を報告した[2)]。また、同様の条件でナス科のピーマンを生育し水耕液をHPLC分析したところ、4’-ketoRfとも別の未知化合物のピークを検出した。本報告では、新たに発見された未知化合物の同定を試み、4’-ketoRfと共に植物における分布を調査した。

【方法】ピーマンを鉄欠乏条件下で水耕栽培し、黄色化した水耕液をC-18カラム、diode array detector（DAD）を用いてHPLC分析を行った。次に鉄欠乏条件下の水耕液中に存在した未知化合物の同定を行うため、同水耕液をロータリーエバポレーターにて濃縮した。濃縮した水耕液を脱塩後、C-18カラムを用いて未知化合物の分取を行った。単離した化合物の化学構造をLC-MS、NMRにより同定した。ウリ科、ナス科植物における分布調査のため、キュウリ、マクワウリ、ゴーヤ、カボチャ、ナス、ピーマン、トウガラシ、トマト、タバコの水耕液をHPLCで分析した。4’-ketoRfの生合成系の調査のため、キュウリをEDTA鉄（可溶鉄）添加条件下、酸化鉄（不溶鉄）添加条件下に分けて育成し、生育から0日目、2日目、4日目、6日目の根を採取してRNAを抽出した。

【結果】鉄欠乏条件下でピーマン水耕液中に分泌された新たな未知化合物はフラビン化合物であることが DAD 解析により示唆された。LC-ESI-TOFMS 解析の結果、MS/MS データからフラビン化合物の分子式は $C_{17}H_{18}N_4O_6$ と決定された。このフラビン化合物と Rf の MS/MS データから、同化合物は酸化されたリビトール鎖を持つケトフラビンであると示唆された。そこで NMR 解析を行い、このケトフラビンは 2’-ケトリボフラビン(2’-ketoRf)であると構造決定された。4’-ketoRf、2’-ketoRf の分布を調査した結果、鉄欠乏条件下の水耕液から Rf と共に、ウリ科植物からは主に 4’-ketoRf が、ナス科植物からは主に 2’-ketoRf の分泌が観察された。しかし、ナス科のトマトは flavin を分泌せず、ナス科のタバコは 4’-ketoRf と 2’-ketoRf の両方の分泌が見られた。キュウリの 4’-ketoRf 生成経路は RNA-Seq により解析中である。1)Satoh, J. et al. (2016) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 80,1347-6947　2)2016 年　日本農芸化学大会　佐藤ら

flavin, iron deficiency, Capsicum annuum L. var. 'grossum'

講演番号：2A29a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟北 A29 会場

蛍光性ウメ花粉の発達異常の解析とそのミツバチ訪花行動への影響
Pollen development and fluorescence of Japanese apricot in relation to the foraging behavior of honeybees

○平井 伸博[1]、森 信之介[1]、新間 秀一[2]、増子（鈴木） 潤美[3]、渡辺 正夫[3]、中西 テツ[4]、月岡 淳子[5]、後藤 勝実[5]、福井 宏至[6] ([1]京都大院農、[2]大阪大院工、[3]東北大院生命、[4]神戸大農、[5]京都薬大、[6]香川大農)
○ Nobuhiro Hirai[1], Shinnosuke Mori[1], Shuichi Shimma[2], Hiromi Masuko-Suzuki[3], Masao Watanabe[3], Testu Nakanishi[4], Junko Tukioka[5], Katsumi Goto[5], Hiroshi Fukui[6] ([1]Kyoto Univ., [2]Osaka Univ., [3]Tohoku Univ., [4]Kobe Univ., [5]Kyoto Pharm. Univ., [6]Kagawa Univ.)

【目的】多くの植物の花粉や葯は UV (365 nm) 照射下で自家蛍光を示す。この蛍光の機能として、UV からの雄性遺伝子保護と送粉昆虫の視覚的誘引が考えられる。我々はこれまで花粉/葯に含まれる蛍光物質を同定するとともに、セイヨウミツバチが蛍光に選好性を示すことを明らかにしてきた。ウメは主要果樹の中で特に収量が低く不安定である。その原因として、自家不和合性を有すること、主要品種に雄性不稔性品種が含まれること、開花期が早いことから低温障害を受けやすく雌蕊が正常に発達しないことなどが指摘されている。一方、ウメの雄性稔性品種は蛍光を示さないのに対し、雄性不稔性品種は葯が蛍光を示すことが知られている。このことから我々は、葯の蛍光の有無が送粉昆虫の訪花行動に影響を与えている可能性に着目し雄性稔性品種の南高の葯を観察したところ、無蛍光性の葯/花粉と青色蛍光を示す葯/花粉を持つ 2 種類の花があることを見出だした。そこでこれら 2 種類の葯/花粉の形態ならびに成分の違いを詳細に分析比較した。それらの結果を報告するとともに、その違いがミツバチの訪花行動に及ぼす影響について考察する。

【結果・考察】目視では、無蛍光性花粉は黄色を示すのに対して、蛍光性花粉は白色を示した。成分分析の結果、無蛍光性葯/花粉には UV 吸収物質 N^1,N^5,N^{10}-tri-*p*-coumaroyllspermidine が、蛍光性葯/花粉には蛍光物質としてクロロゲン酸が多く含まれていることが分かった。黄色花粉は発芽率が約 60%であったのに対し、白色花粉は不稔性であった。電子顕微鏡および Lugol's 染色による観察の結果、稔性の正常花粉は球形であるのに対して不稔性花粉は扁平に潰れた形状で葯内壁に固着しておりエキシンの彫紋も正常花粉と異なっていた。不稔性花粉は原形質分離しており、ポレンコートとインティンが形成されておらず、またデンプンもほとんど検出できなかった。花粉発達過程における形態解析から、異常な葯では一細胞期にタペート組織が空胞化していることが明らかとなった。このことは、タペート細胞から小胞子への物質供給が適正に行われなくなったことにより花粉が不稔化したことを示唆している。異常葯の MS/MS イメージングの結果、クロロゲン酸は葯と花粉の全体に分布していたが、tri-*p*-coumaroylspermidine はどちらにもほとんど検出できなかった。クロロゲン酸は低温によって誘導されることが知られている。これらの結果より、花が低温ストレスを受けた結果、葯の発達段階で代謝異常が起こり、花粉壁の異常形態形成および雄性不稔化が起こったと推定される。

蛍光性花粉の形質とミツバチの蛍光に対する選好性を合わせて考えると、ミツバチは不稔性花粉を持つ花への優先的な訪花によって、受粉率の低下をもたらしている可能性が考えられる。

pollen, fluorescence, honeybee

発表責任者：平井伸博（hirai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A29a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟北 A29 会場

在来カンキツのストレス応答反応における二次代謝物質のプロファイリング
Metabolic profiling of stress related secondary metabolites in Japanese Citrus plants
○伊佐木 芳[1]、松川 哲也[1,2]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大院生物理工、[2]近畿大附属農場)
○Kaoru ISAKI[1], Tetsuya MATSUKAWA[1,2], Shin'ichiro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Grad. Sch. Kindai Univ., [2]Experimental Farm, Kindai Univ.)

【目的】 カンキツ類は古くから世界的に栽培されている果樹作物で、果実に関してはその商業的価値の高さから保存環境や、含まれる代謝産物に関する研究が数多く行われてきた。一方で、葉や枝のストレス応答に関する研究はあまり例がないため、耐病性品種の作出や病害虫防除に資する情報が乏しいのが現状である。我々はカンキツ類の生育過程における環境ストレスと防御応答に着目し、研究を行ってきた。その過程で、数種のカンキツ類の葉において、ストレス応答時に香気成分や一次代謝成分が変動することを見出すとともに、ハッサクの葉から新規の傷害誘導性物質を単離・同定した。本研究ではカンキツ類の防御応答に関する更なる知見を得るため、ストレス応答反応時において、系統間で共通する変動や系統特異的な変動を示す物質の探索を目的とした。今回は近畿大学附属農場に保存されているカンキツ類のうち、ウンシュウミカン、キシュウミカン、ハッサク、ブンタンの在来種 4 種の葉を対象として、LC/TOFMS を用いた不揮発性二次代謝物質の網羅的解析を行い、これらのストレス応答性の相関を検討した。

【方法および結果】 実験材料は、近畿大学附属農場にて栽培されているカンキツ類のうち、ウンシュウミカン、キシュウミカン、ハッサク、ブンタンの在来種 4 種の成熟葉を用いた。採取直後の葉に 6 mm 間隔で刺傷を与え、これを蒸留水に浮かべて 25℃、常光下で一定時間培養した試料を傷害処理葉とした。また採取直後に傷害関連ホルモンであるサリチル酸およびジャスモン酸の 0.2 mM 溶液に葉柄部を浸した状態で培養した試料をストレス関連ホルモン処理葉とした。各処理葉は液体窒素中で磨砕した後、メタノールを加えて懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清を回収して粗抽出液とした。抽出液を高分解能質量分析計である Triple TOF (ABSCIEX)に供し, Information Dependent Acquisition 法により検出した結果、各処理葉より 300 個以上のピークが検出された。得られたピークデータを多変量解析に供した結果、数種のストレス応答性ピークが見いだされた。さらに各処理に応答していると考えられるピークの解析と品種間の比較を行った結果、品種特異的なピークや品種間で共通すると考えられるピークも見いだされたので、それらの結果を報告する。

Citrus plants, secondary metabolites, metabolic profiling

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A29a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟北 A29 会場

スギの含有成分の分析
Composition Analysis of the Extracts from Sugi Organs
○伊ケ崎 知弘、菱山 正二郎、楠本 倫久、掛川 弘一、松井 直之、二村 典宏、大平 辰朗（森林総研）
○ Tomohiro IGASAKI, Shojiro HISHIYAMA, Norihisa KUSUMOTO, Koichi KAKEGAWA, Naoyuki MATSUI, Norihiro FUTAMURA, Tatsuro OHIRA (FFPRI)

スギ（*Cryptomeria japonica*）は日本の重要な森林資源の一つである。しかし，日本では，例年 2 月から 4 月にかけて，スギ花粉症が深刻な問題となっている。8 月ごろから形成が始まるスギ雄花芽内の花粉になる組織は 10 月になると，花粉母細胞から減数分裂期および四分子期を経て，10 月末にはすべて小胞子になっている。また, 10 月上旬のスギ林に入ると, 主に数種のテルペノイドの混合によって生じると考えられる甘い香りを嗅ぐことができる。そこで，この時期のスギ雄花芽や葉などの器官から有用な成分等が抽出できないかと考え，本研究を行った。まず，日本に住む人が安心してスギと接触できるかを確認するため，9 月下旬～11 月初旬までのスギ雄花芽の成長段階がどのように変化しているのかを解析した。すると，10 月初旬までのスギ雄花芽には花粉母細胞のみが存在し，それが，10 月上旬から中旬にかけて減数分裂期が多くなり, さらに 10 月中旬から下旬にかけては減数分裂期，四分子期を経て小胞子期に入り始め，10 月末にはすべてが花粉の原型である小胞子になった。この期間ごとにスギ花粉のアレルゲン遺伝子がどの程度発現しているかを調べてみたところ, 10 月初旬までのスギ雄花芽にはスギ花粉症のアレルゲン遺伝子の発現はほとんど観察できなかった。ステージが進むにつれいくつかのアレルゲン遺伝子の発現は増加したが，それでも 10 月末から 11 月上旬のスギ雄花芽では，主要なアレルゲン遺伝子である *Cry j 1*，*Cry j 2* の発現は低いままであった。したがって，10 月初旬頃のスギから有用な成分等が抽出できるのであれば，花粉の生成を抑制すると同時に利用価値が高まると考えられる。この時期のスギ雄花芽と針葉を採取し，それぞれの器官を分けて，匂いを嗅ぐと，異なる香りのように感じられた。また，雄花芽の匂い成分は水蒸気蒸留や超臨界二酸化炭素を用いた抽出方法で容易に抽出することできた。スギ雄花芽と針葉の香気成分をヘキサン及び SPME で抽出し GC-MS 分析による比較・検討を行った。テルペノイド組成に大きな違いは認められず，サビネン，エレモール類が両方の揮発性成分として検出された。したがって，未熟雄花芽に特有の香りは，未検出の低極性成分及びテルペノイド含有量の相違によって生じている可能性があると考えられた。

Cryptomeria japonica, aroma components, male strobili

発表責任者：伊ケ崎知弘（iga@affrc.go.jp）

講演番号：2A29a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟北 A29 会場

傷害ストレスにより誘導されるゼニゴケの二次代謝産物に関する研究

Wounding stress induces the accumulation of secondary metabolites in the model liverwort *Marchantia polymorpha*

○高橋 公咲、吉川 麻友、ルオ ウェイフェン、小西 結花、松浦 英幸（北大院農）
○ Kosaku TAKAHASHI, Mayu YOSHIKAWA, Weifeng LUO, Yuka KONISHI, Hideyuki MATSUURA (Hokkaido Univ.)

「背景・目的」

植物は、傷害ストレスに対して独自の防御応答機構を有している。高等植物においては、傷害ストレスにより二次代謝産物が防御応答物質として誘導されることが知られている。その一方で、陸上植物の基部に位置する苔類において、傷害応答としての二次代謝産物誘導に関する報告はほとんど無い。本研究では、苔類のモデル植物であるゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）の傷害応答としての二次代謝産物誘導機構の解明を試みた。

「方法・結果」

1/2 ガンボーグ B5 寒天培地で生育させたゼニゴケに傷害を与え、1 時間後に植物体をメタノールで抽出した。本メタノール抽出物を HPLC で分析した結果、傷害処理によりいくつかの HPLC ピークの強度が増加していた。これらの HPLC ピークを指標として各種クロマトグラフィーによりゼニゴケのメタノール抽出物の精製を行ったところ、3 種類の化合物が単離された。各種スペクトルデータを解析した結果、これらの化合物は、フラボノイドの luteolin および apigenin、さらには苔類に特有な bisbibenzyl 骨格を持つ isoriccardin C であることが明らかとなった。また、いずれの化合物も傷害処理 1～2 時間後に内生量が一過的に増加することが示された。

上記の 3 化合物の生合成には、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の関与が推定された。大腸菌において作製されたゼニゴケの組換えフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（MpPAL）は PAL 活性を示した。また、半定量 PCR 法により *MpPAL* の発現量を解析した結果、その遺伝子発現量は傷害処理により上昇していた。

これらの結果から、ゼニゴケの傷害応答として *MpPAL* 遺伝子の発現が誘導され、ビスビベンジル類およびフラボノイド類などの二次代謝産物の生合成が促進されることが明らかにされた。従って、ゼニゴケが高等植物と同様に傷害ストレス応答の一つとして二次代謝産物生合成誘導機構を有していることが明らかとなった。

Wounding, Secondary metabolite, *Marchantia polymorpha*

発表責任者：高橋　公咲（kosaku@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A29a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟北 A29 会場

イネのファイトアレキシン生産における種内多様性
Natural variation of phytoalexin production in rice

○小久保 悠[1]、村田 晃一[1]、假谷 佳祐[1]、上野 琴巳[1]、寺石 政義[2]、奥本 裕[2]、森 直樹[2]、石原 亨[1]([1]鳥取大農、[2]京都大院農)
○Yu KOKUBO[1], Koichi MURATA[1], Keisuke KARIYA[1], Kotomi UENO[1], Masayoshi TERAISHI[2], Yutaka OKUMOTO[2], Naoki MORI[2], Atsushi ISHIHARA[1] ([1]Tottori Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景と目的】 植物は病原菌の感染に応答して、抗菌活性をもつ低分子化合物ファイトアレキシンを蓄積する。イネでは、フラボノイドのサクラネチン、テルペノイドのモミラクトン類、オリザレキシン類、ファイトカサン類など 15 種類以上のファイトアレキシンが報告されている。これまでに、サクラネチンとその前駆体であるナリンゲニンの蓄積量が品種により異なっており、種内多様性（ナチュラルバリエーション）が存在することが見出された。しかし、テルペノイド型のファイトアレキシンの蓄積については研究されていなかった。そこで本研究では、テルペノイド型ファイトアレキシンのモミラクトンおよびオリザレキシンの蓄積について種内多様性を調べた。

【方法】モミラクトン A、B、およびオリザレキシン A を紫外線を照射したイネの葉から単離した。得られた化合物を標準化合物とし、LC-MS/MS を用いたマルチプルリアクションモニタリングによる一斉分析法を確立した。植物材料には、農業生物資源ジーンバンクから分譲された世界のイネ・コアコレクション 69 品種を用いた。これは世界各地のイネ約 3 万 7 千品種から来歴情報等に基づいて、形質に大きな多様性を持つ品種を選抜したものである。それぞれの品種を播種から約 18 日間生育させた後、第三葉に 72 時間紫外線を照射した。これを 80%メタノールで抽出し、ファイトアレキシンを定量した。イネのファイトアレキシンの中には、外部からの刺激の有無に関わらず籾殻に蓄積するものもある。そこで、同様の方法で籾殻も抽出し分析を行った。

【結果】 紫外線を照射した葉を分析したところ、ファイトアレキシンの蓄積量は品種によって大きく異なっていた。モミラクトン類の場合、全く蓄積しない品種から 500 nmol/gFW 程度の蓄積量を示す品種が存在した。モミラクトン類を蓄積する品種はジャポニカ種に多く、インディカ種には少なかった。オリザレキシン A の場合には、さらに少数の品種のみが蓄積することがわかった。また、紫外線照射した葉にモミラクトン類を高濃度に蓄積した品種は、籾殻にも比較的高濃度のモミラクトン類を蓄積していた。オリザレキシン A は全ての品種において籾殻にはほとんど蓄積していなかった。以上の結果から、イネには、テルペノイド型ファイトアレキシンに関して複数のケモタイプがあり、大きな種内多様性を示すことが明らかになった。

rice, phytoalexin, natural variation

発表責任者：石原亨（aishihara@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A29a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟北 A29 会場

酵素凍結保護作用を示すデハイドリンのドメインに関する研究

A study of the domain of dehydrin which shows the cyoprotection of enzyme

○大久保 智博[1]、神谷 慶太[1]、亀山 阿由子[1]、原 正和[1,2]([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン研)
○Tomohiro OHKUBO[1], Keita KAMIYA[1], Ayuko KAMEYAMA[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【はじめに】デハイドリンは、植物における代表的な LEA（late embryogenesis abundant）蛋白質であり、種子の成熟後期や、低温・乾燥ストレスを受けた時に発現する天然変性蛋白質である。デハイドリンの主な機能として、高い酵素凍結保護活性が知られている。最近、われわれは、本活性が、デハイドリンの保存配列 K セグメント（リジンを含む 15 アミノ酸配列 EKKGIMEKIKEKLPG）の疎水性アミノ酸に依拠することを示した。一方、K セグメント以外の領域に活性が存在するか否かは、明らかにされていない。そこで、本研究では、シロイヌナズナの 10 デハイドリンのうち、アミノ酸配列が最も長く、かつ、K セグメント以外のアミノ酸数が最も多い COR47 に着目した。COR47 の K セグメント以外の配列の酵素凍結保護活性を探索した。
【結果と考察】COR47 は 265 アミノ酸からなり、K セグメントを 3 カ所有する。そこで、K セグメント以外の領域（220 アミノ酸）を、15 アミノ酸ずつ切り分け、14 カ所の非 K セグメント、つまり Non-K セグメント（以下 NK とする）を設計した（NK1～NK14)。低温感受性酵素として知られる乳酸脱水素酵素（LDH）の凍結保護活性を調査したところ、NK3 に最も高い活性が見られた。NK3 の配列は K セグメントの配列とは異なるが、その活性は K セグメントと同レベルであった。さらに、NK3 は、LDH の凝集（光散乱法）と変性（疎水性蛍光プローブ法）を効果的に抑制した。次に、NK3 の配列を改変し、活性に影響を与える配列要因を調べた。NK3（DRGLFDFLGKKEEEV）の疎水性アミノ酸全てを、親水性の非電荷アミノ酸（スレオニン)、塩基性アミノ酸（リジン)、酸性アミノ酸（グルタミン酸）に、それぞれ置換したところ、全ての変異ペプチドの LDH 凍結保護活性は完全に失われた。一方、NK3 の塩基性アミノ酸（リジンとアルギニン)、又は酸性アミノ酸（グルタミン酸とアスパラギン酸）を、それぞれスレオニンに置換した場合、活性は維持された。

以上の結果から、COR47 には、K セグメント以外に、酵素凍結保護活性を示す配列（NK3）が存在し、その活性発現には疎水性アミノ酸が不可欠であることが判明した。これまで、デハイドリンの酵素凍結保護作用は、親水性に富む天然変性領域によると考えられてきた。しかし、K セグメントのみならず、非 K セグメントの活性領域においても、疎水性アミノ酸が活性発現に不可欠であることから、デハイドリンの酵素凍結保護活性には、疎水性相互作用が関与する可能性がさらに高まった。

dehydrin, cryoprotection, hydrophobicity

発表責任者：原正和（hara.masakazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A29a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟北 A29 会場

アブラナ科植物の自家不和合性におけるリガンド受容体複合体の結晶構造
Crystal structure of the ligand-receptor complex in *Brassica* self-incompatibility

○村瀬 浩司[1]、森 智行[2]、劉 瀟[2]、真坂 知帆[2]、平野 良憲[2]、浅野（下里） 裕子[2]、高田 美信[3]、渡辺 正夫[3]、磯貝 彰[2]、箱嶋 敏雄[2]、高山 誠司[1] ([1]東大院生科・応生化、[2]奈良先端大・バイオ、[3]東北大院・生命)
○ Kohji Murase[1], Tomoyuki Mori[2], Xiao Liu[2], Chiho Masaka[2], Yoshinori Hirano[2], Hiroko Shimosato-Asano[2], Yoshinobu Takada[3], Masao Watanabe[3], Akira Isogai[2], Toshio Hakoshima[2], Seiji Takayama[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Biol. Sci., Nara Inst. of Sci. and Tech., [3]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.)

被子植物の多くは種の遺伝的多様性を保つために、自己と非自己の花粉を識別し、自己の花粉を拒絶することで自殖を防ぐ自家不和合性というシステムを進化の過程で獲得してきた。アブラナ科植物の自家不和合性は *S* と呼ばれる一遺伝子座上に存在する複数のハプロタイプ（S_1, S_2, …, S_n）によって制御されている。この *S* 遺伝子座上には雌ずい側因子の受容体キナーゼ SRK (*S*-receptor kinase) と花粉側因子であるリガンド SP11 (*S*-locus protein 11)がコードされており、両者の *S* ハプロタイプ特異的な結合と、それに続く SRK 細胞内キナーゼドメインの活性化により、花粉拒絶反応が誘導されることが知られている。しかしながら、SRK による SP11 の自他識別機構や SP11 依存的な SRK の活性化機構など、多くの未解明な部分が残されたままである。

そこで、本研究では SRK と SP11 の *S* ハプロタイプ特異的な認識および受容体活性化機構の解明を目的として、SRK-SP11 複合体の X 線結晶構造解析を行った。SRK 細胞外ドメインの発現タンパク質は凝集する性質があるため、S_8-SRK に 11 箇所のアミノ酸変異を入れたタンパク質エンジニアリングを行い(S_8-mSRK)、昆虫細胞の分泌系で安定的な発現を可能にした。次に S_8-mSRK-S_8-SP11 複合体の結晶を作製して高輝度放射光施設 SPring-8 にて反射データの収集を行い、ネイティブの結晶で 2.6 Å、セレノメチオニンラベルされた結晶で 3.5 Å の反射データを得た。位相決定は短波長異常分散法 (SAD)で行い、最終的に 2.65 Å の分解能で S_8-mSRK-S_8-SP11 複合体の構造を決定した。

S_8-mSRK-S_8-SP11 複合体は 2：2 で結合した 4 量体構造を形成しており、SP11 は 2 分子の SRK によって形成された溝にはまり込んでいた。SRK は HV (Hyper variable) I~III と呼ばれるハプロタイプ間で配列が大きく異なる領域が存在することが知られているが、SP11 は片側の SRK の HV I~III 領域で構成される溝にはまり込んでおり、もう一つの SRK 分子にある HV II 領域が形成する面によって挟まれていた。これらのことから、SP11 が SRK の HV 領域に結合して SRK を 2 量体化する事により、SRK の活性化を誘導していることが示唆された。また、これらの領域から形成される SP11 結合ポケットはハプロタイプ間で多様な分子表面を形成しており、SRK によるハプロタイプ特異的な SP11 認識を可能にしていると推察された。

self-incompatibility, *Brassica*

講演番号：2A29a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟北 A29 会場

ナス科植物の自家不和合性に関わる S-RNase の X 線結晶構造解析
Structural analysis of the S-RNase involved in *Petunia* self-incompatibility

○辻田 絵梨[1]、村瀬 浩司[1]、平野 良憲[2]、森 智行[2]、久保 健一[1]、円谷 徹之[3]、箱嶋 敏雄[2]、高山 誠司[1] ([1]東大院生科・応生化、[2]奈良先端大・バイオ、[3]大阪大院・産業科学研究所)
○Eri TSUJITA[1], Kohji MURASE[1], Yoshinori HIRANO[2], Tomoyuki MORI[2], Kenichi KUBO[1], Tetsuyuki ENTANI[3], Toshio HAKOSHIMA[2], Seiji TAKAYAMA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Nara Inst. of Sci. and Tech., [3]Osaka Univ.)

多くの被子植物は種の遺伝的多様性を保つため、自己と非自己の花粉を認識して自己の花粉を拒絶することで自殖を防ぐ自家不和合性というシステムを進化の過程で獲得してきた。ナス科植物の自家不和合性は *S* と呼ばれる一遺伝子座の複数のハプロタイプにより制御されており、花柱側の持つ *S* 遺伝子型と花粉側が持つ *S* 遺伝子型が一致すると花粉が拒絶される。この *S* 遺伝子座上には雌ずい側決定因子であり RNA 分解酵素をコードする *S-RNase* と花粉側決定因子であり F-box タンパク質をコードする複数の *SLF* 遺伝子が存在する。花粉管に侵入した S-RNase は RNA を分解することで花粉管の伸長を妨げると考えられており、約 18 の SLF は分担して非自己の S-RNase を認識し、無毒化することが知られている。しかし、なぜこの複数の SLF が非自己の S-RNase はすべて認識できるのにもかかわらず、自己の S-RNase を認識できないのか、そのメカニズムは未解明である。

そこで、本研究では S-RNase 型自家不和合性における自他識別機構のタンパク質構造化学的な解明を目的として、ナス科植物ペチュニアの S-RNase、2 系統に関して X 線結晶構造解析を行った。ピキア酵母で発現させた S_9-RNase とペチュニアの花柱より精製された S_5-RNase の結晶を作製して反射データの収集を行い、分子置換法を用いてそれぞれ 2.2 及び 2.3 Åの分解能で立体構造を決定した。

非対称単位中に S_5-RNase は 2 分子、S_9-RNase は 3 分子存在しており、それぞれの構造はほぼ同一であった。S_5-RNase と S_9-RNase の構造を重ねて比較したところ、主鎖の構造に大きな相違は観察されなかった。S-RNase にはハプロタイプ間で配列の保存度の低い HV (Hyper variable)領域が存在することが知られており、この HV 領域について比較すると、側鎖構造の違いから分子表面の形が異なっていることが明らかになった。また、表面電荷ポテンシャルの計算から HV 領域は S_5-RNase が負に S_9-RNase が正に荷電していることが判明した。これらの結果から S-RNase の HV 領域が形成する分子表面の形や表面電荷が SLF による S-RNase の識別に関わっていると推測された。

self-incompatibility, *Petunia*

講演番号：2A29a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟北 A29 会場

シロイヌナズナの低温シグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング
Screening of chemical compounds that inhibit cold-signaling pathway in Arabidopsis
○三原 良太、稲葉 靖子、稲葉 丈人（宮崎大農）
○Ryota MIHARA, Yasuko ITO-INABA, Takehito INABA (Miyazaki Univ.)

温帯以北に生息する多くの植物は、夏から冬への移行に伴い一定期間凍らない程度の低温にさらされると、その後襲ってくるさらに低い温度にも耐える能力を獲得する。この現象を「低温馴化」という。モデル植物であるシロイヌナズナの場合、-5℃程度の低温ストレスを受けると細胞が損傷し、結果的に植物体は枯死する。一方、低温馴化したシロイヌナズナは-10℃近い低温にも耐えることができる。植物が凍結耐性を獲得できる理由は、低温馴化の過程において遺伝子発現を調節することで、細胞の生理機能や構造を大きく変化させるからである。例えば、シロイヌナズナが低温ストレスを受けると転写因子である CRT/DRE 結合因子(CBF/DREB)の発現が一過的に誘導される。CBF/DREB は低温応答遺伝子プロモーター上流の CRT/DRE 領域に結合して標的遺伝子の発現を誘導する。最近の研究では、低温シグナル伝達には温度センサーなど未知の因子が関与していることが示唆されており、低温シグナル伝達に影響を与える化合物を同定できれば低温応答機構をより詳細に理解できると予想されている。私たちは、これまでに低温シグナル伝達に影響を与える化合物のスクリーニング系構築を行ってきた。具体的には、水中栽培したシロイヌナズナに低温処理またはアブシジン酸（ABA）を添加することで凍結耐性が上昇するかどうか調査した。その結果、水中栽培したシロイヌナズナでも低温または ABA を添加することで凍結耐性が上昇することが明らかになった。

そこで、このスクリーニング系を用いて、本研究では低温シグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニングを試みた。まず、形質転換シロイヌナズナ *COR15AproATG:LUC*(*COR15A:LUC*)を水中栽培法で生育させた。生育させた *COR15A:LUC* をシクロヘキシミド(CHX)存在下で低温処理し、ルシフェラーゼ(LUC)活性を調査した。その結果、CHX を処理した *COR15A:LUC* の LUC 活性が低下した。そこで、CHX をポジティブコントロールとして用い、低温馴化した *COR15A:LUC* の LUC 活性を抑制する化合物の同定を試みた。約 500 種類の化合物のスクリーニングを行った結果、13 種類の化合物を同定できた。興味深いことに、それらの化合物には構造や作用機構に類似性がみられた。現在、これらの化合物処理がシロイヌナズナの低温馴化に及ぼす影響を調査しており、その結果についても併せて報告する。

Cold acclimation, *Arabidopsis*, Chemical compounds

講演番号：2A29a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟北 A29 会場

シロイヌナズナ液胞ルーメンタンパク質の液胞輸送に関わる輸送モチーフの研究
Analysis on the trafficking motif involved in vacuolar-sorting of vacuolar lumenal proteins in *Arabidopsis thaliana*

○高畑 周平[1]、久我 一弘[2]、松波 絵里香[1]、清水 英寿[2]、地阪 光生[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]、西村 浩二[1] ([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]島根大・生物資源)
○Shuhei Kohata[1], Kazuhiro Kuga[2], Erika Matsunami[1], Hidehisa Shimizu[2], Mitsuo Jisaka[2], Kazushige Yokota[2], Tsuyoshi Nakagawa[1], Kohji Nishimura[1] ([1]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

クラスリン被覆小胞（CCV）は、真核生物におけるトランスゴルジ網（TGN）や細胞膜（PM）の膜タンパク質（積荷タンパク質）を種々のエンドソームに輸送する役割をもつ。CCVはクラスリントリスケリオンとアダプタータンパク質AP複合体からなる。AP複合体は5つのサブタイプがあり、それぞれ特有のタンパク質の輸送経路を担っている。さらにAP複合体は、CCVで運ばれる積荷タンパク質に存在する積荷認識配列（CRS）に結合して、積荷タンパク質を特異的に選抜する機能をもつことが広く知られている。植物細胞の液胞は分解型液胞と貯蔵型液胞の2種類が存在しており、いずれも植物の成長に重要な役割を果たしている。それぞれの液胞で機能する液胞ルーメンタンパク質は小胞体（ER）で合成され、主にCOPⅡ小胞およびCCVによって液胞へ輸送される。この液胞輸送には、液胞タンパク質とその受容体が持つ積荷認識配列（CRS）が重要であることが知れられている。この受容体の1つに、一回膜貫通型タンパク質である液胞選別受容体VSRがある。液胞タンパク質はERにおいてVSRなどにより選別されて、膜小胞輸送経路により液胞へ輸送される。液胞タンパク質の液胞輸送を担うCRSとして、N末端側の保存性の高い配列特異的液胞選別決定因子（sequence-specific vacuolar sorting determinant, ssVSD）、C末端側の疎水性の高い液胞選別決定因子（carboxyl-terminal VSD, ctVSD）、そして分子内部にある物理的構造性液胞選別決定因子（physical structure VSD）の主に3種類が知られている。これらの輸送モチーフが、特異的な液胞タンパク質受容体により認識されて液胞タンパク質は液胞に適切に輸送されると考えられている。本研究では、液胞ルーメンタンパク質として、シロイヌナズナアリューレイン様タンパク質（Arabidopsis aleurain-like protein、AALP）を用いて、AALPのCRSに着目して液胞輸送との関連性を解析した。この発表では、VSRによるAALPの認識特異性と液胞輸送におけるAALPのCRSの役割について論議する。

Arabidopsis, membrane trafficking, BiFC

発表責任者：西村浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A29a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟北 A29 会場

シロイヌナズナ PAMP 受容体の膜小胞輸送に関わる輸送モチーフの研究
Analysis on the trafficking motif involved in the membrane vesicle trafficking of PAMP receptor in *Arabidopsis thaliana*

○塚本 真嗣[1]、常 愛花[2]、清水 英寿[2]、地坂 光生[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]、西村 浩二[1]([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]島根大・生物資源)
○Masashi Tsukamoto[1], Aika Tsune[2], Hidehisa Shimizu[2], Mitsuo Jisaka[2], Kazushige Yokota[2], Tsuyoshi Nakagawa[1], Kohji Nishimura[1] ([1]Inter. Cent. Sci. Res., Shiman Unive., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

シロイヌナズナキチン受容体キナーゼ（CERK1）は、病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular pattern、PAMP）誘導性免疫に関わる膜貫通型パターン認識受容体（Pattern-recognition receptor、PRR）である。細胞膜において真菌の細胞壁に由来するキチンオリゴマーを認識すると、細胞内キナーゼドメインによる自己リン酸化を経て、MAPK カスケードを活性化し植物免疫を誘導する。また代表的な PRR として知られる FLS2 は、植物病原性細菌の鞭毛タンパク質 flagellin を PAMP として認識し MAPK カスケードを活性化した後、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる。そして、この取り込みは情報伝達のダウンレギュレーションであると考えられている。

クラスリンは近年植物のエンドサイトーシスの主要な実行分子であることが報告されている。クラスリン被覆小胞（CCV）はクラスリントリスケリオンと AP 複合体の 2 種類の被覆タンパク質複合体からなり、AP 複合体は 5 種類に分けられる。複数あるクラスリン輸送経路を各 AP 複合体が分担しており、そのうち AP2 が植物のエンドサイトーシスに関わると報告されている。AP2 は 4 つのサブユニット（α/β/μ/σ）から構成されるヘテロ四量体であり、それらが CCV で輸送される積荷タンパク質のチロシンモチーフやジロイシンモチーフなどの積荷認識配列（CRS）を認識して CCV に積荷タンパク質が詰め込まれると考えられているが、植物での積荷タンパク質の選別機構に関する知見は十分とは言えない。昨年度の本大会において、当研究グループは AtCERK1 のクラスリンエンドサイトーシスの検討を行い、膜輸送小胞への選別機構について、AtCERK1 の細胞質尾部に存在する 10 個の CRS モチーフのうち、チロシンモチーフ 3 個とジロイシンモチーフ 5 個の計 8 個が、AP2 のμサブユニット（AP2M）やσサブユニット（AP2S）と相互作用する可能性があることを報告した。

そこで本大会では、上記 8 つのモチーフを各々変異させた AtCERK1-CRS 変異体を持つシロイヌナズナ形質転換植物 8 種における AtCERK1-CRS 変異体の細胞内での動態を、野生型 AtCERK1 と比較しながら報告する。併せて、チロシンモチーフ変異体とジロイシンモチーフ変異体の両者の違いについても議論したい。

Arabidopsis, membrane trafficking, BiFC

発表責任者：西村 浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A29a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟北 A29 会場

ソテツ（*Cycas revoluta*）雄花の発熱におけるシアン耐性呼吸酵素の役割と分子同定
Identification of two *AOX* genes, *CrAOX1* and *CrAOX2*, and their possible roles in the male cone thermogenesis of the gymnosperm *Cycas revoluta*
○倉山 侑也、山本 知奈、片山 陽子、稲葉 靖子（宮崎大農）
○Yuya KURAYAMA, Haruna YAMAMOTO, Yoko KATAYAMA, Yasuko INABA (Miyazaki Univ.)

【背景と目的】裸子植物ソテツ（*Cycas revoluta*）は、日本の固有種であり、九州南部と沖縄諸島に自生地を持つ。*C. revoluta* は一般的に雌雄異株であり、ケシキスイ科等の昆虫をポリネーターとして利用することが知られている。*C. revoluta* の雄花では、開花期において数日間に渡り活発な発熱が観察されるため、雄花による熱産生は、揮発性の臭い成分を効果的に発散させ、ポリネーターを誘引して生殖効率を高める役割を持つことが示唆されている。植物の発熱分子機構に関しては不明な点が多いが、発熱植物を用いたこれまでの研究により、サトイモ科やハス科などの被子植物では、発熱期や発熱組織においてミトコンドリアの末端酸化酵素であるシアン耐性呼吸酵素 AOX の働きが活発であり、AOX が植物の発熱に役割をもつと考えられている。しかし一方で、発熱植物を含むザミア科やソテツ科等の裸子植物では、発熱と AOX との関係性については、知見が極めて乏しい。そこで本研究では、発熱期にあるソテツ雄花の主要組織を用いて、ソテツの発熱における AOX の役割および発熱に関与する AOX の分子諸特性を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】ソテツ雄花の主要組織である小胞子葉および小胞子のうからミトコンドリアを調製して、酸素電極を用いて、各組織由来ミトコンドリアの呼吸諸特性の解析を行った。その結果、小胞子葉ミトコンドリアでは、小胞子のうミトコンドリアに比べて、シアン耐性呼吸経路（AOX 経路）の働きが活発であることがわかった。小胞子葉および小胞子のうミトコンドリアタンパク質を SDS-PAGE で分離して、抗 AOX 抗体を用いたイムノブロッティングにより AOX タンパク質の発現を調べたところ、小胞子葉ミトコンドリアでは AOX タンパク質が検出されたが、小胞子のうミトコンドリアでは検出されなかった。続いて、小胞子葉で観察されたシアン耐性呼吸に関与する AOX の分子同定を行うため、degenerate primer を用いた *AOX* 遺伝子のクローニングを行った。その結果、２つの異なる *AOX* 遺伝子（*CrAOX1* および *CrAOX2*）が同定された。複数の植物 AOX 配列を用いた系統樹解析から、CrAOX1 と CrAOX2 は、明確に異なる２つのサブファミリー（AOX1 および AOX2）に分類された。ソテツ雄花における各 *AOX* 遺伝子発現の組織特異性を RT-PCR により調べた結果、興味深いことに、*CrAOX1* は小胞子葉で高く発現しており、一方で、*CrAOX2* は小胞子のうで高く発現していた。以上の結果から、ソテツ（*C. revoluta*）雄花では、小胞子葉で主として発現する CrAOX1 を介したシアン耐性呼吸が、発熱に役割を持つことが示唆された。

cone thermogenesis, mitochondria, alternative oxidase

発表責任者：稲葉靖子（ykoina@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A29a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟北 A29 会場

発熱植物ザゼンソウの葉由来プロトプラストを用いたシアン耐性呼吸酵素 AOX の解析

Functional analyses of mitochondrial alternative oxidase using leaf protoplasts from thermogenic skunk cabbage *(Symplocarpus renifolius)*

○前川 春彦、溝口 幸一郎、片山 陽子、稲葉 靖子（宮崎大農）
○Haruhiko MAEKAWA, Koichiro MIZOGUCHI, Yoko KATAYAMA, Yasuko INABA (Miyazaki Univ.)

【背景と目的】植物の一部には、細胞内呼吸を活発化させ発熱を誘導する発熱現象が見られる。発熱は主に花や花序等の生殖器官で起こり、原始的な種子植物を中心として約 80 種の植物で報告されている。花の発熱には、ポリネーターである訪花昆虫の誘引や寒冷環境における低温ストレス回避等の生理的意義があると考えられている。サトイモ科植物ザゼンソウ(*Symplocarpus renifolius*)は、寒冷地や山岳地の湿地帯に生息しており、氷点下を含む寒冷環境下でも自ら代謝を活発にして発熱を誘導する能力がある。そして、約 1-2 週間に渡り花序の体温を 23 ºC 前後に維持する安定性と持続性を有しており、発熱植物の中では、茎頂培養による増殖や栄養成長期にある株の栽培技術が確立された数少ない植物の一つである。ザゼンソウの恒温性の仕組みはまだ分かっていないが、ミトコンドリアの末端酸化酵素であるシアン耐性呼吸酵素 AOX が、余剰エネルギーを解消する過程で熱を出すと考えられている。しかしながら、AOX と発熱との因果関係については依然として不明な点が多い。そこで本研究では、本植物の発熱における AOX の役割を明らかとするため、本植物由来プロトプラストを用いた分子遺伝学ツールの開発を行い、本実験系を用いた AOX の機能解析を目指した。
【方法と結果】まず、一般のモデル植物で汎用されている方法を参考にして、ザゼンソウの葉の葉身あるいは葉柄から、高純度のプロトプラストを得ることに成功した。PEG 法により *35S::GFP* および *35S::SrAOX1-GFP* を本植物の葉由来プロトプラストに導入して、形質転換を行った各プロトプラストからタンパク質を抽出した。抽出した当該タンパク質画分に対して抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングを行った結果、GFP および AOX1-GFP タンパク質の発現が確認された。また、蛍光顕微鏡を用いた観察により、*35S::GFP* 発現プロトプラストと *35S::SrAOX1-GFP* 発現プロトプラストでは、観察される緑色蛍光の細胞内局在が異なることを明らかとした。次に、GFP 特異的 siRNA を *35S::GFP* および *35S::Luciferase* と一緒にプロトプラストへ導入して、RNA 干渉効果の検証を行った。その結果、導入した GFP 特異的 siRNA は、形質転換したプロトプラストのルシフェラーゼ活性には影響を与えなかったが、当該プロトプラストにおける GFP の発現を特異的に抑制することが分かった。以上の解析により、発熱植物ザゼンソウの葉由来プロトプラストでは、形質転換が可能であり、RNAi による特定遺伝子の発現抑制も可能であることが分かった。現在、これらの技術を用いて、*SrAOX1* の機能に関する詳細な解析を進めており、合わせて報告したいと考えている。

Floral thermogenesis, Cellular respiration, Plant mitochondria

発表責任者：稲葉靖子（ykoina@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A29a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟北 A29 会場

玄米外観品質における高 CO_2 の影響
Effect of elevated CO_2 on appearance quality of rice grains
○若松 和[1]、齋藤 誠志[2]、猪俣 拓也[1]、金古 堅太郎[2]、Baslam Marouane[2]、三ツ井 敏明[1,2]([1]新潟大院、自然科学、[2]新潟大農、応生化)
○ Nodoka WAKAMATSU[1], Masashi SAITOH[2], Takuya INOMATA[1], Kentaro KANEKO[2], Marouane BASLAM[2], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech, Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ.)

産業革命以降，人間活動による大気中への温室効果ガス排出の増加により，地球温暖化が深刻な問題となっている．最も主要な温室効果ガスである CO_2 の大気中濃度は，現在の約 400ppmv から今世紀末までに約 700ppmv までの上昇が予想されている．一般的に，CO_2 濃度の上昇は作物栽培において好条件として働く．イネにおいても，CO_2 濃度の上昇により光合成が促進されて，デンプンの蓄積が増加しバイオマス及び玄米の収量が増加したことが報告されている．一方，近年 FACE 実験により，高 CO_2 環境で育成したイネにおいて，白濁米の発生が増加することが明らかになってきた．イネ種子における白濁米の発生は，これまで登熟期の高温条件により発生することが知られており，その白濁化機構の解明が進められてきた．しかし，高 CO_2 による玄米白濁化のメカニズムは，まだほとんど解明されていない．我々は，メカニズム解明の第一歩として，高 CO_2 によって白濁米が多発する時期及び条件の特定を試みている．

本実験では，温度・湿度・CO_2 濃度等の制御が可能な大型の閉鎖温室を使用した．はじめに，CO_2 濃度条件のみを変化させて整粒率を測定したが，高 CO_2 そのものの品質への影響は小さいことが示唆された．そこで，高 CO_2 に加え強光を同時に与えた，複合ストレス条件で同様の実験を行ったところ，整粒率が 50%以上低下した．この整粒率低下の原因は，白濁米（特に背白米）の増加であった．

発生した白濁米のメタボローム解析を行ったところ，クエン酸サイクルの代謝物の増加が見られた．しかしこの増加は，整粒率に差が見られなかった高 CO_2 濃度のみを変化させた実験でも同様であり，現在のところ白濁米の発生に直接的な関わりは見いだせていない．一方で，複合ストレス実験時に測定した光合成や茎数，乾燥重量などの値と整粒率を用いて行った主成分分析から，光合成の変化量や，気孔コンダクタンス及び葉温の変化と整粒率に相関傾向が確認された．

これらのことから，CO_2 濃度の上昇そのものは植物にとって大きなストレスではなく，高 CO_2 により気孔が閉じたところに，太陽光などの強い日差しが当たることで葉温や穂温が上昇して，高温障害を受け白濁米が増加したことが推測される．したがって，CO_2 濃度の上昇に伴う応答が，玄米外観品質の高温障害を助長させている可能性が示唆された．

elevated CO_2, rice, grain quality

講演番号：2A29p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟北 A29 会場

トマトの有機栽培における最適な土壌条件の確立

Suitable soil condition for tomato cultivation under organic farming system

○朴木 慎治[1]、小橋 勇也[2]、ADHIKARI Dinesh[1]、荒木 希和子[1]、久保 幹[1]([1]立命館大生命、[2]立命館大院生命)
○Shinji HONOKI[1], Yuya KOBASHI[2], Dinesh ADHIKARI[1], Kiwako S. ARAKI[1], Motoki KUBO[1]
([1]Ritsumeikan Univ., [2]Ritsumeikan Grad.)

【背景・目的】

トマト（*Solanum lycopersicum* L.）は世界で最も多く栽培されている野菜の一つである。トマトはタンパク質や糖質を初め、ビタミンやミネラルなどの栄養素を多く含む栄養価の高い野菜であり、ビタミン A、ビタミン C、およびリコピンなどの抗酸化物質も豊富に含んでいる。抗酸化物質は有害な活性酸素種を除去することにより発がんのリスクを軽減する効果や、紫外線から肌を保護する効果が知られている。

トマトは化学肥料や農薬を用いた慣行農法によって栽培されるのが一般的である。しかし近年、環境への負荷の軽減、健康への配慮などの点から有機農法による栽培が望まれるようになってきた。しかしながら、有機農法は慣行農法に比べて収量が低く、安定しないという課題がある。そこで、トマトの有機栽培に最適な土壌条件を探索することを本研究の目的とした。

【方法・結果】

実験圃場において化学肥料および有機肥料を施肥し、トマトの栽培実験を行った。有機条件の圃場については、主に全炭素量（TC)、全窒素量（TN)、炭素対窒素比（C/N 比）を調整し、条件ごとに 24 m^2 の区画を用いた。

有機条件でのトマトの収量は 1,290～5,960 kg/0.1 ha となり、その中で最も高い収量を示した条件は、 TC 33,000 mg/kg, TN 1,600 mg/kg, C/N 比 21 であった。また、全ての有機条件において高い総細菌数（$\geq 9.0 \times 10^8$ cells/g-soil）を示し、収量が高くなった条件においては高い窒素循環活性、リン循環活性を示した。さらに、トマトの品質において重要な指標であるリコピン、グルタミン酸、糖、酸については、収量が高くなった条件において高い値を示した。これらの結果から、収量の高い条件では土壌の生物性（総細菌数、窒素循環活性、リン循環活性)、およびトマトの品質が向上していたことが分かった。最終的に、トマトの収量および品質を向上させるための最適な土壌条件は、TC 30,000～36,000 mg/kg、TN 1,600～1,900 mg/kg、C/N 比 20 程度であると考えられた。

tomato, organic cultivation, soil microbe

講演番号：2A29p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟北 A29 会場

植物の連作障害を軽減するウルトラファインバブル水の効果
Effect of ultra-fine bubble water to reduce injuries due to continuous planting of plants
○横山 峰幸[1]、山下 貴敏[2]、田中 和広[2]、瀬尾 茂美[3]、阿部 貞夫[4]、土屋 好司[1]、酒井 秀樹[5]、朽津 和幸[1]([1]東理大理工、[2]（株）田中金属、[3]農研機構生物機能利用研究部門、[4]（株）ヨシカ、[5]東理大総研)
○Mineyuki YOKOYAMA[1], Takatoshi YAMASHITA[2], Kazuhiro TANAKA[2], Shigemi SEO[3], Sadao ABE[4], Koji TSUCHIYA[1], Hideki SAKAI[5], Kazuyuki KUCHITSU[1] ([1]Tokyo Univ of Sci, Fac of Sci and Tech, [2]Tanaka Kinzoku Corp, [3]NIAS, NARO, [4]Yoshika Corp, [5]Tokyo Univ of Sci, Res Inst for Sci and Tech)

ウルトラファインバブル水（UFB）とは、ナノメートルレベルの微細な気泡を含有する水で、半導体工場での洗浄など、様々な分野で産業上の利用が図られている。UFB を農業に利用する試みも行われており、農作物の成長を促進するとの報告もあるが、その分子機構は不明の点が多い。本研究では、将来的な農業への活用を視野に入れて、ポータブルな UFB 作成装置に着目し、植物は土壌中や植物に付着する微生物と影響を与え合いながら生育することを踏まえて、植物が生育する土壌中の微生物の影響を解析した。

UFB は活性酸素種（Reactive Oxygen Species, ROS）を含むとの報告がある。そこで、UFB 内の ROS の定量方法を検討した。マイクロプレートを用いた MCLA 発光法を用いて、高感度・簡便に ROS を定量する実験系を確立した。

(株)田中金属製作所から市販されているシャワーヘッド型の UFB 発生器（TN、TNA）と共に、TN を加圧・循環させるタイプ（TNPA）を試作し、UFB を作成した。ROS を定量したところ、TN や TNA に比べて TNPA において、高い superoxide anion radical ($^{\cdot}O_2^-$)が検出された。ナノサイト（Malvern 社）を用いて、気泡の粒径と数を測定したところ、それらの間で気泡数と ROS 生成量に高い相関が見られた。

TNPA を用いて、連作障害がある土壌でレタスとトマトの発芽及び初期の成長についてセルトレイを用いて調査した。レタスは水道水、トマトは純水をそれぞれ対照に用いた。いずれも連作障害土壌では発芽率が低下したが、UFB はそれを回復する傾向を示した。さらに、発芽した個体のその後の成長は UFB 区で顕著に促進された。また、植物病害菌の増殖を直接抑制する可能性を調べる目的で青枯病菌の in vitro culture で TNPA の作用を調べたところ、TNPA は青枯病菌の増殖を抑制する効果をもつことが分かった。

以上のように、UFB が土壌中の微生物の組成に影響を与えて植物の成長を促進する可能性が示された。UFB の植物に与える影響としてこのような観点から証明した研究は初めてのことであるが、今後、UFB の微生物に与える効果は更に詳細な研究が必要である。土壌中の有害微生物に対する植物の抵抗性や植物の成長に対する UFB の効果についても、検討を行う予定である。

ultra-fine bubble, reactive oxygen species, injuries due to continuous planting of plants

発表責任者：横山峰幸（mineyuki.yokoyama@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2A29p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟北 A29 会場

好熱菌発酵産物が抗酸化機能を有する人参の生産性と機能性に与える影響評価
Effects of thermophile-fermented compost on the fecundity and function of carrot with anti-oxidant activity.
○松浦 真紀子[1,2]、宮本 浩邦[1,2,3]、松下 映夫[2]、石井 千歳[2]、中熊 映乃[2]、小野瀬 暁[2,4]、児玉 浩明[1]、澤田 有司[5]、平井 優美[5]、茂田 勝美[6]（[1]千葉大・園芸、[2]（株）サーマス、[3]理研・IMS、[4]京葉プラントエンジニアリング（株）、[5]理研・環境資源 CSRS、[6]タキイ種苗）
○Makiko MATSUURA[1,2], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Teruo MATSUSHITA[2], Chitose ISHII[2], Teruno NAKAGUMA[2], Takashi ONOSE[2,4], Hiroaki KODAMA[1], Yuji SAWADA[5], Yumi HIRAI[5], Katsumi SHIGETA[6] ([1]Chiba Univ., [2]Sermas Co., Ltd., [3]Riken IMS, [4]Keiyo Plant Engineering Co., Ltd., [5]Riken CSRS, [6]Takii & Co., Ltd.)

*Bacillaceae*によって安定的に構成された好熱菌群によって海産資源を75℃前後で発酵した産物を栽培土壌に添加すると、土壌の微生物叢(フローラ)が変化し、植物体内の硝酸態窒素含量が低下やアミノ酸濃度の増加傾向、並びに生体防御関連遺伝子を発現させる傾向があることが葉菜類で報告されている（***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, **97**:1349-1359, 2013、日本農芸化学会)。本研究では、根菜類のモデルとしてニンジン(タキイ種苗ファイトリッチシリーズ・京くれない)を用いて、当該発酵産物が生産性と機能性に与える影響を解析した。基肥として緩効性肥料(10-10-10-1-5)200g/m2、苦土石灰100g/m2を施肥し、試験区では発酵粉末15g/m2を施肥した。三回の栽培試験の結果、慣行区に対して試験区では、収穫根重として2%, 19%, 44%の増加傾向が確認された。また、収穫物の糖度をBrixを指標として検証すると同等であったが、葉緑素計を用いたSPAD値を比較すると、試験区では数値が増加していた。そこで、収穫後の葉と根部の機能成分をメタボローム解析によって網羅的に調べた結果、葉と根部の双方において慣行区よりも試験区で３倍以上有意に増加した成分として、必須アミノ酸の一つであるL-PhenylalanineとL-Tryptophane、コラーゲン合成や保湿作用に関与するアミノ酸であるL-proline、旨味に関わるアミノ酸であるL-Glutamic acid、並びに抗酸化能を有するポリフェノールの一種であるフラボノイドのうち、luteolin-4'-O-glucoside、kaempferol-3-O-glucoside、apigenin-7-O-glucosideが確認された(n=5;p<0.001)。また、カロテノイド濃度を確認した結果、有意差はないもののalpha-caroteneとbeta-caroteneに増加傾向があり、lycopeneは有意差を持って増加傾向を示した。さらに、DPPH法によって抗酸化活性を解析した結果、根部で増加する傾向が確認された。供試作物である京くれないは、品種として抗酸化活性の高い機能性人参であるが、発酵産物の施肥によってポリフェノールやカロテノイドの増加に伴い、抗酸化機能が向上し、併せて各種生理機能や旨味に関与するアミノ酸が増加する傾向があることが示唆された。以上の結果から、好熱菌発酵産物は、根菜類のうちニンジンの生産性と機能性を向上させ得ることが期待された。

thermophile, metabolomics, carrot

発表責任者：宮本浩邦（h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A29p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟北 A29 会場

枯草菌由来の環状リポペプチドによるシロイヌナズナの病害抵抗性誘導応答

Response on disease resistance of *Arabidopsis thaliana* induced by Bacillus cyclic lipopeptides

○椎名 繁晶[1]、梶川 揚申[2]、五十君 靜信[2]、篠原 弘亮[3]、横田 健治[2]([1]東農大院農、[2]東農大応生科、[3]東農大農)

○Shigeaki SHIINA[1], Akinobu KAJIKAWA[2], SHIZUNOBU IGIMI[2], Hirosuke SHINOHARA[3], Kenji YOKOTA[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Agr., Tokyo Univ. Agr.)

【目的】

Iturin 及び surfactin は、*Bacillus* 属が分泌する環状リポペプチド(cLP)である。両 cLP は広範な抗菌スペクトルを示す抗菌活性物質であり、それらの抗菌活性が cLP 生産性 *Bacillus* 属細菌の植物病害に対する生物防除活性の主体であると予想されていた。だが近年では、cLP の新規機能として、宿主植物に対する病害抵抗性誘導能が報告されている。cLP による病害抵抗性誘導には、cLP 分子種と植物種間に厳密な特異性があるとされている。また、互いに拮抗する全身獲得抵抗性（SAR）と誘導全身抵抗性（ISR）の 2 種類の病害抵抗性誘導経路を同時に誘導するとされており、既知のエリシターとは異なる挙動を示すことが予想されている。一方、我々はシロイヌナズナを宿主として両 cLP の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果を検証したところ、両 cLP は共に病害抑制効果を示すが、顕著な病害抑制効果を示す cLP 処理濃度域が異なり、さらに両 cLP は共に過剰な処理濃度では、病害抑制効果が消失する奇異な表現型を示した。そこで本研究では、両 cLP のシロイヌナズナに対する病害抵抗性誘導機構の解明を目的として、シロイヌナズナの変異株を宿主とした cLP 処理による病害抑制効果を検証した。

【方法及び結果】

シロイヌナズナを水耕栽培し、水耕液に cLP を添加して cLP 根部処理を行った。cLP 処理後 2 日目に *Pseudomonas syringe* pv. *maculicola* を葉面に infiltration 法で接種した。接種後、経日的に発病率を計測して病害抑制効果を評価したところ、両経路の発現に共通して必須となる転写調節因子 NPR1 の欠損株、並びに SAR 経路のシグナル物質であるサリチル酸の生合成欠損株において、両 cLP 共に病害抑制効果は認められなかった。一方、ISR 経路のシグナル物質であるジャスモン酸の生合成欠損株では、両 cLP 共に野生株と同等の病害抑制効果が認められた。

【考察】

シロイヌナズナに対する両 cLP の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果には、NPR1 を介し、サリチル酸をシグナル物質としたシグナル伝達経路が主体となることが強く示唆された。更に、ジャスモン酸を介したシグナル伝達経路は cLP による病害抑制効果には関与しないことも示唆した。

Bacillus subtilis, Cyclic lipopeptides, Induced disease resistance

発表責任者：横田　健治（yokota@nodai.ac.jp）

講演番号：2A29p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟北 A29 会場

タバコ懸濁細胞に対するエリシター処理によって誘導される細胞壁タンパク質の変動

Analysis of protein expression in tobacco cell wall induced by elicitor treatment

○中村 優子[1,2]、宮下 正弘[1,2]、宮川 恒[1,2] ([1]京都大学大学院農学研究科、[2]日本農芸化学会)
○Yuko NAKAMURA[1,2], Masahiro MIYASHITA[1,2], Hisashi MIYAGAWA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)

［目的］植物の病原菌に対する生体防御システムは動物の免疫とは異なり、個々の細胞が病原菌の接近や侵入を認識して防御応答を誘導する。細胞壁は感染ストレスに対して最初の認識や応答が行われる部位であり、その構成分子が防御応答を誘導することも知られている。しかし、細胞壁タンパク質と防御応答との関係についての知見は乏しく、いまだ未解明の部分が多い。そこで本研究では、感染ストレス条件下における細胞壁タンパク質の役割について新たな知見を得るため、タバコ懸濁細胞に対するエリシター処理後の細胞壁タンパク質の発現の変動について調べた。
［方法］タバコ懸濁細胞（Xanthi）に対する防御応答の誘導には、当研究室で発見されたペプチド性エリシターである PIP-1（YGIHTH-NH_2）を用いた。培地に終濃度が 100 μM となるよう PIP-1 を添加し、24 時間振とう培養した。処理後の細胞を液体窒素中で破砕した後、細胞質成分を遠心により除去し、細胞壁画分を単離した。これを 200 mM Ca^{2+}存在下で撹拌することで、細胞壁と比較的弱い相互作用で結合している細胞壁タンパク質を抽出した。得られたサンプルの総タンパク質濃度は Bradford 法により測定した。次に、サンプルを二次元電気泳動に供して網羅的に解析した。PIP-1 処理時にのみ出現するタンパク質スポットをゲル内トリプシン消化した後、MALDI-TOF/TOF による MS/MS 分析を行ってタンパク質を同定した。変動の見られたタンパク質については、さらに LC/MS/MS を用いて定量的に評価した。定量には MRM 法を用い、タンパク質のトリプシン消化断片ペプチドをターゲットとした。ターゲットペプチドの選択は Skyline ソフトウェアを用いておこない、固相法によって合成した標品ペプチドを用いて分析条件を最適化した。得られた MRM 条件を用い、PIP-1 処理前ならびに処理後のタバコ細胞壁タンパク質の消化物を分析した。
［結果］細胞壁由来の総タンパク量を測定した結果、PIP-1 処理後に顕著な減少が見られることが分かった。続いて、タバコの細胞壁タンパク質を二次元電気泳動法によって分析した結果、PIP-1 処理時にのみ確認されたスポットが存在した。MS/MS 解析の結果、これらは PR タンパクの一種である β-1,3-glucanase であると判明した。このタンパク質の変動を定量的に評価するため、MRM 法による測定条件を確立し、その測定を行ったところ、PIP-1 処理によってタバコ細胞壁中のβ-1,3-glucanase の発現量は約 1.3 倍増加することが分かった。以上の結果から、β-1,3-glucanase は病原菌と植物細胞のインターフェイスである細胞壁で、初期の防御応答に寄与していることが示唆された。

cell wall protein, plant defense, mass spectrometry

講演番号：2A29p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟北 A29 会場

イネの Ca^{2+}-依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構
Induction mechanism of hypersensitive response cell death mediated by Ca^{2+}-dependent protein kinase 8 in rice

○土本 尚輝[1]、神村 麻友[2]、榊原 悠大[2]、倉林 諒[2]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ)
○Naoki TSUCHIMOTO[1], Mayu KAMIMURA[2], Yuta SAKAKIBARA[2], Ryou KURAHAYASHI[2], Fang-Sik CHE[1,2] ([1]Grad. Sch. of BioSci. Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Dept. of Bio-Sci. Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.)

イネに褐条病細菌 *Acidovorax avenae* 非病原性 N1141 菌株を接種すると、植物の免疫反応である過敏感細胞死が誘導される。過敏感細胞死の誘導機構を明らかにするため、過敏感細胞死誘導時に発現変動する遺伝子を調べたところ、Ca^{2+}依存性プロテインキナーゼ 8 をコードする遺伝子（*OsCPK8*）が特異的に発現上昇することが明らかとなった。そこで、イネ細胞内で *OsCPK8* を一過的に過剰発現させたところ、明瞭な過敏感細胞死が誘導された。さらに、OsCPK8 の RNAi ノックダウン形質転換イネを作製したところ、この形質転換体は過敏感細胞死の誘導能を欠失していた。これらの結果より、OsCPK8 はイネ過敏感細胞死の誘導に関与することが明らかとなったので、次に、OsCPK8 による過敏感細胞死誘導機構について調べた。まず、イネ培養細胞に N1141 菌株を接種した後の OsCPK8 の細胞内局在について調べたところ、OsCPK8 は通常は細胞膜に局在するが、N1141 菌株を接種した直後から OsCPK8 の核への移行が観察された。さらに、OsCPK8 が細胞膜に局在するのに必要な N 末端領域に存在するミリストイル化モチーフを欠損させた OsCPK8 をイネプロトプラストで発現させたところ、OsCPK8 は核に局在し、同時に過敏感細胞死も誘導された。一方、キナーゼの活性中心に変異を導入した OsCPK8 をイネ細胞内で発現させても過敏感細胞死は誘導されないことも明らかになり、OsCPK8 による過敏感細胞死の誘導には OsCPK8 のリン酸化活性と核への移行が必須であることが明らかになった。

Plant immunity

講演番号：2A29p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟北 A29 会場

フラジェリン分子の異なるエピトープを認識する植物免疫システムの解析
Analysis of the plant immune system recognizing different epitope sites within flagellin molecule
○村上 貴彦[2]、今尾 優吾[2]、桂木 雄也[1]、平井 洋行[1]、古川 岳人[1]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大学院・バイオ)
○Takahiko Murakami[2], Yugo Imao[2], Yuya Katsuragi[1], Hiroyuki Hirai[1], Takehito Furukawa[1], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Dept. of Bio-Sci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech, [2]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech)

植物は、細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを認識して免疫反応を誘導することが明らかになっている。シロイヌナズナにおいては、フラジェリンの中でも N 末端領域に存在する flg22 を FLS2 という受容体型キナーゼを介して認識することが知られている。以前、我々は、イネが flg22 ではなく、フラジェリンの C 末端領域の CD2-1 を受容体型キナーゼである FliRK2 で認識して免疫反応を誘導することを明らかにした。また、トマトにおいてもフラジェリンの N 末端領域に存在する flgII-28 を FLS3 受容体で認識し免疫反応を誘導することが示され、同一分子内の異なる部位を認識して同様の免疫反応を誘導するという新たなシステムの存在が示唆された。そこで、フラジェリンの異なる部分をエピトープとする認識システムの役割とその進化的知見を得るために、これらの認識システムがどのような植物種に存在しているかについて調べた。フラジェリンの認識後に誘導される免疫反応である活性酸素の発生やカロースの沈着、防御関連遺伝子の発現を指標として、それぞれの植物種における CD2-1、flg22、flgII-28 の認識能を調べた。その結果、双子葉類であるシロイヌナズナ、タバコ、ミヤコグサ、および単子葉類であるハチクは、flg22 を認識するが、CD2-1 と flgII-28 を認識することができず、双子葉類であるトマトは、flg22 と flgII-28 を認識するが、CD2-1 を認識することができないことが明らかになった。また、単子葉類であるイネとミナトカモジグサは、CD2-1 を認識するが、flg22 と flgII-28 を認識することができなかった。さらに、単子葉類であるアスパラガスは flg22 と CD2-1 を認識するが、flgII-28 を認識できないことが明らかになった。これらの結果から、flg22 認識システムは双子葉類と単子葉類を含む広い植物種に存在しており、CD2-1 認識システムは単子葉類にのみ、flgII-28 はトマトにのみ存在していることが示された。

Flagellin, Epitope, Plant immune system

発表責任者：村上 貴彦（b110187@nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：2A29p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟北 A29 会場

H_2O_2 プライミングはイネの高温不稔と品質低下を改善する

H_2O_2 priming improves rice grain quality and spikelet fertility under high temperature stress

○流石 有希子[1]、三井 悠大[1]、金古 堅太郎[2]、Baslam Marouane[2]、三ツ井 敏明[1,2]([1]新潟大院自然研、[2]新潟大農)
○ Yukiko SASUGA[1], Yudai MITSUI[1], Kentaro KANEKO[2], Marouane BASLAM[2], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech, Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem, Niigata Univ.)

地球温暖化は現在我々が直面している最も深刻な環境問題の一つであり、それに伴うイネの高温不稔やコメの品質低下が問題となっている。高温不稔とは、出穂開花期の気温上昇によりイネの稔実率が低下するという現象である。今後地球温暖化による気温上昇が続くとイネの稔実率が低下し、収量の低下につながると考えられる。さらに、イネ登熟期の高温ストレスによって高温登熟乳白が発生し、コメの外観品質を低下させる。このように高温によるイネへの様々な影響が報告されており、早急な改善が求められている。本研究では、イネに高温耐性を付与する方法として H_2O_2 プライミングについて研究し、そのメカニズムを通してイネの高温登熟耐性の仕組みの解明を目指している。
我々は登熟期の高温ストレス前に 10μM H_2O_2 処理を行うプライミングによってイネに高温登熟耐性を付与できることを見出した。イネが開花する直前に H_2O_2 プライミングを行うことで、高温によって頻出する不稔を改善するだけでなく、乳白米の発生を抑制することができた。そこで、高温障害を改善するメカニズムを明らかにするために、開花後のイネ胚乳の遺伝子発現を経時的に調べた。まず、乳白の発生の原因の一つとして考えられているα―アミラーゼの遺伝子発現を調べた結果、高温によって発現が誘導される *Amy3E* や *Amy1A*、*Amy1C* の発現が H_2O_2 プライミングによって抑制されていた。さらに、もう一つの原因として考えられる高温による活性酸素種（ROS）の蓄積があるのか調べるために、ROS 消去系酵素の遺伝子発現を調べた。その結果、イネ胚乳においてカタラーゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現が H_2O_2 プライミングにより誘導されていた。
H_2O_2 プライミングは、高温によって生じる胚乳内でのデンプン生合成・分解の異常や ROS の蓄積を抑えることができる可能性が示唆された。

hydrogen peroxide, heat stress tolerance, rice

講演番号：2A29p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟北 A29 会場

H_2O_2 代謝ネットワークを介した植物の光ストレス応答機構

Light stress response via H_2O_2 metabolism networks in plants

○三冨 弦、菊樂 香奈、寺井 佑介、小川 貴央、石川 孝博、丸田 隆典（島根大・生資科・生命工）
○Gen MITOMI, Kana KIKURAKU, Yusuke TERAI, Takahisa OGAWA, Takahiro ISHIKAWA, Takanori MARUTA (Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】活性酸素の一種である H_2O_2 は細胞毒性とシグナル機能の両方を有するため、その量的制御は植物のストレス応答・耐性能と密接な関係にある。C_3 植物の葉では光合成や光呼吸から H_2O_2 が生成されるため、葉緑体とペルオキシソームが主要ソースとなる。前者ではアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（sAPX および tAPX）が、後者ではカタラーゼ（CAT）がそれぞれ H_2O_2 消去酵素として機能する。これらの酵素の働きを免れた H_2O_2 は細胞質型 APX（APX1）によって消去されうる。H_2O_2 は比較的安定で膜透過性を持つことから、各コンパートメントに局在する H_2O_2 消去酵素は互いに相補的に機能しうると考えられるが、このような視点からの研究例は少ない。興味深い事例として、シロイヌナズナの CAT 欠損株（*cat2*）の光ストレス感受性が細胞質型 APX（APX1）の欠損により回復することが報告されている。本研究では、光ストレス下における H_2O_2 代謝のコンパートメント間クロストークを明らかにすることを目的とし、*apx1*（細胞質）、*sapx tapx*（葉緑体）および *cat2*（ペルオキシソーム）の多重変異株を作出・解析した。
【結果】過去の知見と一致して、*cat2* の強光ストレス感受性は APX1 の欠損（*apx1 cat2*）により回復した。これらの変異株における細胞内レドックスステータスを評価したところ、*cat2* の細胞死のトリガーとなる酸化型グルタチオン（GSSG）の蓄積が *apx1 cat2* において有意に抑制され、同時にアスコルビン酸レベルの低下も緩和されることがわかった。また最近、*cat2* での GSSG 蓄積にはデヒドロアスコルビン酸還元酵素（DHAR）活性が必要であることが報告された。これらを踏まえると、*cat2* で生じる大量の H_2O_2 は細胞質型 APX によって消去され、この反応により DHAR への基質（酸化型アスコルビン酸）供給が過剰になり、結果として GSSG が蓄積するモデルが考えられた。対照的に、葉緑体型 APX の欠損は *cat2* の光ストレス感受性を促進する傾向がみられたが、グルタチオンやアスコルビン酸への影響はなかった。さらに、*apx1 sapx tapx cat2* 四重変異株を作出したところ、*apx1 cat2* でみられた細胞死の緩和は完全に消失し、いずれの多重変異株よりも顕著な光ストレス感受性を示した。現在、GSSG の下流でシグナルとして機能するサリチル酸の定量や応答遺伝子の解析を進めている。

ascorbate peroxidase, redox regulation, light stress

講演番号：2A29p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟北 A29 会場

シロイヌナズナにおけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素のアスコルビン酸再生への寄与

Contribution of dehydroascorbate reductases to ascorbate recycling in Arabidopsis

○寺井 佑介、上野 祐美、小川 貴央、石川 孝博、丸田 隆典（島根大・生資科・生命工）
○YUSUKE TERAI, HIROMI UENO, TAKAHISA OGAWA, TAKAHIRO ISHIKAWA, TAKANORI MARUTA (Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

植物において、アスコルビン酸は最も豊富に存在する水溶性抗酸化剤であり、細胞内レドックス緩衝剤として不可欠である。アスコルビン酸の生理作用の多くは還元型に依存するため、酸化型からの再生が重要となる。植物は二電子酸化型のデヒドロアスコルビン酸（DHA）の特異的な還元酵素（DHAR）を有する。この酵素はグルタチオンを電子供与体として利用し、DHA に対して高い親和性（Km＝~数十 μM）を示す。そのため、DHAR はアスコルビン酸再生系の鍵酵素であると考えられてきたが、決定的な証拠はない。本研究では、シロイヌナズナに存在する三つの DHAR 遺伝子を全て欠損させた変異株（Δ*dhar*）を作出し、アスコルビン酸再生能力への影響を検証した。

全 DHAR 遺伝子の欠損により、グルタチオン依存 DHAR 活性はほとんど検出不可になったが、通常および強光条件下のアスコルビン酸レドックス状態には影響しなかった。一方、強光照射にともなう総アスコルビン酸の蓄積はΔ*dhar* において最大で約 20%低下しており、これは DHAR 反応産物である酸化型グルタチオンの生成抑制と一致した。したがって、DHAR は強光下でのアスコルビン酸レベルの維持に関与することが示されたが、その重要性は不明瞭であった。DHAR の DHA への高い親和性を考慮すると、この酵素はアスコルビン酸レベルの低い状況でこそ重要な役割を担う可能性が考えられたため、アスコルビン酸欠乏株（*vtc2*）との四重変異株（Δ*dhar vtc2*）を作出した。しかし、通常および強光条件の両方で *vtc2* およびΔ*dhar vtc2* におけるアスコルビン酸レベルおよびレドックス状態に差はみられなかった。これらの結果を総合すると、DHAR は高濃度のアスコルビン酸レベルの維持には必要であるが、中程度以下の濃度では他の経路によって十分に相補されることが示された。

次に、Δ*dhar* の DHA 還元能力を評価するため、野生株およびΔ*dhar* の葉に水または DHA を処理し、アスコルビン酸レベルを測定した。いずれの植物体においても DHA 処理によって著しい総アスコルビン酸量の増加が認められ，そのほとんどが還元型として検出された。このことは外部処理した DHA が細胞内で還元型へと再生されていることを示すが、驚くべきことに、ジェノタイプ間での差はみられなかった。さらに、同様の結果はグルタチオン欠乏変異株（*pad2*）でもみられた。

以上より、DHAR はストレス時のアスコルビン酸プールサイズの維持には関与するが、同酵素活性やグルタチオンは DHA の還元に必ずしも必要ではないことが明らかになった。現在、Δ*dhar pad2* 四重変異株を用いた解析を進めるとともに、グルタチオン非依存経路の探索を試みている。

ascorbate recycling, dehydroascorbate reductase, Arabidopsis

講演番号：2A29p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟北 A29 会場

イネのストレス誘導型プレニル二リン酸合成酵素遺伝子の発現制御機構

Transcriptional regulation of stress-inductive prenyltransferase genes in rice

○和田 美樹[1]、冨山 詩歩[1]、田渕 雄夢[1]、吉田 悠里[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、森 昌樹[3]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ、[3]農研機構・生物機能利用研究部門)
○Miki WADA[1], Shiho TOMIYAMA[1], Yumu TABUCHI[1], Yuri YOSHIDA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2], Masaki MORI[3], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]NIAS)

【背景と目的】
イソプレノイドは炭素数 5 のイソプレンを構成単位とした天然化合物であり様々な鎖長を持つ。その生合成を担う酵素はプレニル二リン酸合成酵素と呼ばれ、一定の鎖長の最終産物を与える。植物において、炭素数 10 のゲラニル 2 リン酸(GDP)及び炭素数 20 のゲラニルゲラニル 2 リン酸(GGDP)は、生理活性を保持した様々なイソプレノイドの前駆体となることが知られている。例えば、イネにおいて GDP 由来の揮発性物質リナロールは昆虫忌避作用を示し、GGDP から生合成されるジテルペン型ファイトアレキシンは抗菌活性を持つ。これらの化合物はストレスに応答し誘導的に生産されることから、基質となる GDP と GGDP の量的制御がイネの病害抵抗性維持にとって重要であると考えられる。最近、イネの GDP 合成酵素(GPS)と GGDP 合成酵素(GGPS)の候補遺伝子の解析が進められ、その酵素機能が同定された。GPS と GGPS はそれぞれ昆虫による食害とジャスモン酸処理によって転写レベルで発現誘導を受けることが示されている。しかし、その転写制御機構についての情報はない。そこで本研究では、ジャスモン酸シグナル伝達を介したストレス誘導性を示すイネ GPS と GGPS の転写制御機構を追究すると共に、GPS と GGPS の細胞内での量的変化が最終産物に与える影響を検討する。
【方法と結果】
まず、ジャスモン酸処理による GPS と GGPS の発現変動を、イネの葉身あるいは根を用いたジャスモン酸処理後 24 時間の RNA-seq 解析結果から調べた。その結果、葉身および根のどちらにおいても、GPS と GGPS の発現は RPKM 値で 2 倍から 8 倍の誘導が認められた。これまでに、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産誘導に関わり、ジャスモン酸シグナルの下流で働く転写因子として、主に根で機能する bZIP 型転写因子 OsTGAP1 と全身で機能する bHLH 型転写因子 DPF を取得している。そこで、これらの欠損変異体を用いたジャスモン酸処理時の RNA-seq の結果における GPS と GGPS の発現変動を見てみた。根においては、GPS のジャスモン酸による発現誘導に明白な OsTGAP1 依存性が見られ、葉身においては GGPS のジャスモン酸による発現誘導に DPF が必要であることがわかった。イネ葉身から調製したプロトプラストに DPF を一過的に発現させると、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産誘導が認められることから、この系において GGPS のプロモータ活性化に対する DPF のエフェクター効果の検証を進めている。また、GPS と GGPS をイネプロトプラスト内で一過的に過剰発現させた場合の揮発性物質やファイトアレキシンの生産量の変化についても報告する。

rice, jasmonic acid, isoprenoids

発表責任者：和田美樹（wadam@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A29p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟北 A29 会場

イネの転写因子 DPF は非生物的ストレス誘導的なジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に関与している

A transcription factor DPF is involved in abiotic stress-inducible biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in rice

石川 一輝[1,2]、山村 千紘[1,2]、田渕 雄夢[3]、前田 哲[1]、岡田 憲典[3]、鎌倉 高志[2]、○森 昌樹[1]([1]農研機構・生物機能利用研究部門、[2]東理大院・理工、[3]東大・生物生産工学研究センター)
Kazuki Ishikawa[1,2], Chihiro Yamamura[1,2], Yumu Tabuchi[3], Satoru Maeda[1], Kazunori Okada[3], Takashi Kamakura[2], ○Masaki Mori[1] ([1]NIAS, [2]Grad. Sch. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo)

【目的】
我々はこれまでにイネのジテルペン型ファイトアレキシン（DP）生合成を制御する、bHLH 型転写因子 DPF（Diterpenoid Phytoalexin Factor）について研究を行っている。*DPF* 高発現（OX）イネでは 12 種の DP 生合成遺伝子の発現が顕著に増大し、モミラクトン、ファイトカサン等の DP の蓄積量が増大すること、逆に *DPF* ノックダウンイネでは生合成遺伝子の発現レベルが低下し、DP 蓄積量も低下することを報告している。また、*DPF* は通常、根及び出穂後の穂で高レベルに発現していること、葉ではいもち病感染、塩化銅処理、ジャスモン酸処理、UV 照射などのストレス処理により発現が誘導されることを明らかにしている。これらのストレスにより DP 生合成も促進することが知られているので、このストレス誘導的な DP 生合成が DPF を介するかどうかを明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

【方法・結果】
まず、CRISPR/Cas9 システムによる *DPF* ノックアウト(KO)イネを作出した。*DPF* コード領域の 2 か所に標的配列を設計し、それぞれの標的配列に対応した 2 種類の KO 変異体を取得した。この 2 種類の *DPF*-KO イネ(T2 世代)に各種ストレス処理を施した後、DP 生合成遺伝子である *CPS2*、*CPS4* の発現を解析することで、DP 生合成を制御しているかどうかを確認することにした。今回行ったストレス処理は非生物的ストレスで、UV 照射処理、塩化銅処理の 2 種類である。その結果、どちらのストレス処理でも、WT では 2 つの DP 生合成遺伝子の発現が誘導されたのに対し、KO 変異体では誘導レベルが低かった。以上より、少なくとも UV 照射処理、塩化銅処理という 2 種の非生物的ストレス処理による DP 生合成の誘導は DPF を介していることが明らかになった。また、*DPF*-KO イネの通常時（非ストレス処理時）の根における DP の蓄積量についても確認した。WT 及び KO イネをそれぞれ寒天培地で栽培し、その根から DP を抽出し LC-MS/MS を用い解析したところ、WT に比べ KO イネの方でモミラクトン含量の低下が認められた。

rice, phytoalexin, transcription factor

発表責任者：森昌樹（morimasa@affrc.go.jp）

講演番号：2A29p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟北 A29 会場

乾燥ストレス耐性植物の成長促進制御

Improvement of growth of drought tolerant plants by gene stacking

○工藤 まどか[1]、城所 聡[1]、吉田 拓也[1,2]、溝井 順哉[1]、戸高 大輔[1]、FERNIE Alisdair[2]、篠崎 一雄[3]、篠崎 和子[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]マックスプランク研究所、[3]理研・環境資源)
○ Madoka KUDO[1], Satoshi KIDOKORO[1], Takuya YOSHIDA[1,2], Junya MIZOI[1], Daisuke TODAKA[1], Alisdair FERNIE[2], Kazuo SHINOZAKI[3], Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]MPI-MP, [3]RIKEN CSRS)

【背景・研究意義】

干ばつは、世界的な農作物の減収の主な原因の一つである。植物は乾燥ストレスに遭遇すると浸透圧調節のために糖類を合成して耐性を獲得する一方で、細胞成長を調節して自らの生育を抑制する。そのため、乾燥ストレス耐性を高めた植物はバイオマス量や収量が減少する例が多く、農業上問題となる。その課題解決のため、本研究では乾燥ストレス耐性植物の成長促進に挑戦した。

【研究方法・特色】

乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子を導入し、乾燥ストレス耐性植物の成長を促進させることを試みた。乾燥ストレス耐性遺伝子として *DREB1A* 転写因子、成長促進遺伝子として *PIF* ファミリー転写因子に着目した。*DREB1A* はイネ、トマト、ダイズ、ユーカリなど多くの植物の乾燥ストレス耐性を向上させる有用な遺伝子である。しかし、その過剰発現によって矮化や花成遅延が引き起こされる例が多く、農業上の課題が残されている。*PIF* は避陰応答において機能する遺伝子で、その過剰発現によって植物の細胞伸長を促進することが可能である。本研究では、この DREB1A と PIF の二重過剰発現シロイヌナズナを作製した。個体レベルの解析（乾燥ストレス耐性試験・成長解析）および分子レベルの解析（遺伝子発現解析・代謝物解析）を行い、複数遺伝子の集積が植物に与える影響を評価した。遺伝子集積が植物体へ与える影響を多角的な視点で理解することは、植物の分子育種へ基礎的知見を与える点できわめて重要であると考えられる。

【研究成果】

表現型解析の結果、*PIF DREB1A* 二重過剰発現体は、乾燥ストレス耐性の向上と共に、胚軸伸長促進と花成の早期化が観察された。トランスクリプトーム解析により、*PIF DREB1A* 二重過剰発現体では環境ストレス耐性遺伝子群および細胞伸長関連遺伝子群の発現が誘導されることが明らかとなり、*PIF* と *DREB1A* を植物体中で共発現させた場合、両転写因子は相加的に下流遺伝子の発現を制御することが示された。メタボローム解析により、*PIF DREB1A* 二重過剰発現体では糖類やアミノ酸などの浸透圧調節物質が蓄積することが明らかとなり、この適合溶質の蓄積が乾燥ストレス耐性の向上に寄与したと考えられる。以上より、乾燥ストレス耐性遺伝子と成長促進遺伝子の両者を導入した植物を作製するアプローチは有効であることが示された。本研究によって得られる植物の成長制御に関する基礎的知見は、高バイオマス生産性の乾燥ストレス耐性植物の創出に資すると期待される。

drought stress tolerance, cell elongation, Arabidopsis

講演番号：2A29p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟北 A29 会場

主成分分析と併用した蛍光スペクトルによる植物生育状態モニタリング

Monitoring of plant growth condition using fluorescence spectrum combined with principal component analysis.

○藤田 洋志[1]、植松 寛暁[2]、土田 夏帆[2]、城所 美紀[2]、菊地 俊介[1]、安保 充[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Youji FUJITA[1], Hiroaki UEMATSU[2], Natsuho TSUTIDA[2], Miki KIDOKORO[2], Syunsuke KIKUTI[1], Mitsuru ABO[2] ([1]Grad. Sch. Agri. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】　近年注目されている植物工場において、植物の生育状態をモニタリングするシステムは確立されておらず、作物の生育状態を検知できるようなモニタリングシステムの必要性が示唆される。植物は根から様々な化合物を滲出しており、生育状態によって滲出する化合物の種類や量が変化することに着目した。また、根から滲出する成分は非常に低濃度であるため、高感度に分析できる蛍光物質を用いる方法を検討した。近年の研究では、蛍光スペクトルを主成分分析と併用し、化合物の検出や混合成分の分析等に用いられている[1)]。この方法により、水耕液の蛍光スペクトルの差を検出することで、作物の生育状態を検知できるのではないかと考えた[2)]。

【方法】　水耕作物における生育状態の変化を人為的に作り出すために、塩ストレス・リン酸欠乏条件を設定し、水耕液の蛍光スペクトルをコントロールと比較した。具体的には、ダイズ(*Glycine max*)を、シャーレ上で芽出しし(2 日間、暗所、25℃)、2 日間、1 mM $CaCl_2$ 溶液中でエアレーションしながら水耕した。15 mL チューブに 1/2 MS 培地を入れ、水耕したダイズを入れ替えた。生育は、人工気象器内で行い、2 日おきに蒸散で減少した培地を継ぎ足した。1 週間後、水耕液を 1/2 MS 培地(control)、0.2% NaCl を含む 1/2 MS 培地(塩ストレス)、KH_2PO_4 の代わりに KCl を用いて調整した P を含まない 1/2 MS 培地(P 欠乏)に入れ替えて生育を行った。24 時間後、各チューブの水耕液を 0.20 μm フィルターでろ過し、蛍光分光光度計を用いて、励起蛍光スペクトルを測定した。励起波長は、5 nm ごとに 200～500 nm、蛍光波長は、1 nm ごとに 250～600 nm に設定し、感度 High で測定を行った。蛍光スペクトルのデータを励起 15 nm、蛍光 10 nm ごとの合計 223 区画に分けて蛍光強度を積算し、SPSS ver.24 (IBM)を用いて主成分分析を行った。主成分分析における固有ベクトルを用いて、主成分プロットの分離に強く寄与しているポイントを明らかにし、考察を行った。

【結果・考察】　主成分分析により、Control-塩ストレス-P 欠乏の生育区画ごとにプロットを分離することができた。固有値から、特定波長のスペクトルが 3 区画でのストレス区画の分離、及び Control と塩ストレスの分離に強く寄与していることが分かった。この化合物の滲出量が P の欠乏により増加しているか、塩ストレスにより減少していると考えられる。現在、この化合物を HPLC により分離し、LCMS による同定を試みている。

【参考文献】

1)　S.D.Velioglu *et al*., *J'Dairy Res*. 2017., **84,** 214-219.
2)　藤田ら 日本農芸化学会関東支部 2017 年度支部大会要旨集 p.23

fluorescence spectrum, principal component analysis, root exudates

講演番号：2A29p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟北 A29 会場

自家不和合性ペチュニアの花粉側因子 SLF の分子系統学に基づいた認識標的の予測

Molecular phylogeny-based prediction of recognition target of pollen-S determinant SLF in self incompatibility in *Petunia*

○久保 健一[1]、藤井 壮太[1]、村瀬 浩司[1]、辻田 絵梨[1]、円谷 徹之[2]、高山 誠司[1]([1]東京大・農学生命科学研究科、[2]大阪大・産業科学研)
○Ken-ichi Kubo[1], Sota Fujii[1], Murase Kohji[1], Eri Tsujita[1], Tetsuyuki Entani[2], Seiji Takayama[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】植物の多くは自家不和合性という性質を有し、受粉-受精過程において自己・非自己の花粉を識別し、自殖（近親交配）を回避している。この自他識別は、一般に *S* 遺伝子座のハプロタイプ（S_1, S_2..., S_n）によって制御されており、ここに多型性を示す花粉側と雌ずい側の認識因子がコードされている。ナス科では、雌ずい側因子として単一の *S*-リボヌクレアーゼ（S-RNase）が、細胞毒性によって自己花粉管の伸長を阻害し自家受精を妨げている。一方、花粉側因子 *S*-locus F-boxes（SLF）は、S-RNase を認識し、ユビキチン-プロテアソーム系を介し解毒することによって他家受精を可能にしている。我々はこれまでの研究から、*S* 遺伝子座上には異なった認識特異性を持つ SLFs が複数種類コードされており、それらが全体で協調的に作用することで全ての非自己由来 S-RNase を認識、解毒する「協調的非自己認識機構」を明らかにしてきた（文献 1, 2）。しかし、個々の SLF の認識標的 S-RNase については、これまでに行った網羅的な解析に基づいて一部の組合せが明らかになっているのみである。そこで本研究では、SLF−S-RNase の分子認識機構の解明に向けて、より多くの SLF−S-RNase 認識ペアを探索するための方法を検討した。
【方法】配列の類似性から 18 タイプ（*SLF1*-*SLF18*）に分類される *SLF* 遺伝子を、10 種類の *S* ハプロタイプから単離し、分子系統学的解析を行った。実験的に認識標的 S-RNases が明らかにされている *SLF1*s、*SLF2*s、*SLF3*s について、各 *SLF* の系統樹上の位置と S-RNase 認識の間の関係性を検討した。機能未同定の *SLF9* および *SLF14* について、それらの系統樹パターンから認識標的 S-RNase を推測し、形質転換実験によって推測が正しいことを証明した。
【結果】*SLF1*s、*SLF2*s、*SLF3*s の中で、配列保存性の高い対立遺伝子の産物は、それぞれ S_{17}-RNase、S_9-RNase、S_7-RNase を標的として認識する。一方で *S_{17}-SLF1*、*S_7-SLF3* は他の対立遺伝子との間で配列保存性が低く、*S_9* ハプロタイプは *SLF2* 遺伝子を持たない。このことから、自己認識を避けるため、各ハプロタイプは自身を認識しうる *SLF*s を排除しているという、「欠失-変異」仮説を考案した。この仮説に基づき、*S_{19}* ハプロタイプは *SLF9* を、*S_5* は *SLF14* を持たないことから、SLF9 は S_{19}-RNase を、SLF14 は S_5-RNase を認識すると予想した。*S_7-SLF9*、*S_7-SLF14* をそれぞれ用いた形質転換実験において、S_{19}-RNase および S_5-RNase の解毒が観察されたことから、予測の正しさが証明された。以上の結果を、*SLF* の予想される進化史と関連づけて考察する。
【参考文献】(1) Kubo, K *et al.* (2010) *Science* 330, 796-799. (2) Kubo, K *et al.* (2015) *Nature Plants* 1, 14005.

self incompatibility, non-self recognition, phylogeny

発表責任者：久保健一（akkubo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A29p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟北 A29 会場

植物根端における細胞外マトリクス中の DNA 分析
Analysis of DNA in extracellular matrix of plant root tip
○須山 隆大[1]、大坪 未侑[2]、高橋 契匠[2]、加藤 愛[3]、藤井 紳一郎[3]、安保 充[2]([1]明治大院農、[2]明治大農、[3]産総研計測標準)
○ Takahiro SUYAMA[1], Miyu OTSUBO[2], Keisyo TAKAHASHI[2], Megumi KATO[3], Shinichiro FUJII[3], Mitsuru ABO[2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [2]Meiji Univ., [3]AIST)

【背景・目的】植物根の根端付近には、根端表皮細胞の剥離によって遊離した細胞群が存在しており、これはボーダー細胞と呼ばれる。植物根とボーダー細胞からは多糖類を主成分とするムシラージと呼ばれるゲル状物質のほか、DNA や種々の物質が滲出しており、これらがムシラージに保持されることで細胞外マトリクスを形成している。細胞外における DNA の役割として、植物では植物根近傍の細胞外 DNA が病原菌に対する免疫に寄与していることが示唆されている[1)]。しかし、植物の細胞外 DNA を直接的に分析した例はなく、その機能性や作用機序については不明な点が多い。そこで本研究では、植物根の細胞外マトリクス中に存在する微量の DNA を分析してその鎖長や濃度の変化を調べることを目的とする。その為に、高分子の DNA を分離し、高感度に検出することが可能であるキャピラリーゲル電気泳動(CGE)を用いることとし、CGE の分析条件や試料の前処理法について検討を行った。
【方法・結果】根長 3 cm 程度に生長したダイズおよびトウモロコシの幼根 1 本を、500 μL の 1×TE バッファーに浸した状態で室温の暗所で 24 時間インキュベートした後、根を軽く攪拌することで細胞外マトリクス成分を溶液中に懸濁させる。これを遠心分離にかけて、沈殿画分を除去した溶液を試料とした。
細胞外 DNA の存在を確認する為に、蛍光光度計と蛍光試薬 picogreen®を用いた DNA 定量法を実施した。試料に DNase I を添加して 37℃で 30 分インキュベート後に DNA 濃度を測定し、コントロールと比較した結果、DNase I 処理により DNA 濃度が減少したことから、試料中に DNA が存在することを確認した。
一方で、試料に蛍光試薬 SYBR Gold®を添加して CGE-LIF (Ex/Em=488/537 nm)で分析を行ったところ、DNA のピークは確認されなかった。これを受けて、試料の前処理として proteinase K 処理、CTAB 処理、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿法などを組み合わせて DNA の精製を行い、CGE-LIF で同様に分析した結果、DNA によるものとみられるピークが出現した。当該ピークについては、DNase I 処理によりピークが消失することを確認した。現在は再現性の確認を行うと共に、より最適な前処理法を模索している。また、植物根に外因性ストレスを負荷させた際の細胞外マトリクス中 DNA の鎖長や濃度変化についても検討を進めているので報告する。
1) Hawes M.C. *et al.*, *Plant Soil*, **2012**, *355*, 1–16.

capillary gel electrophoresis, extracellular DNA, root border cells

発表責任者：安保 充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：2A29p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟北 A29 会場

植物根細胞外 ROS とボーダー細胞を用いたストレス応答評価
Evaluation of plant stress response using root apoplastic ROS and border cells
○伊藤 洋輔[1]、矢澤 正道[2]、菊地 俊介[1]、安保 充[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Yosuke ITO[1], Masamichi YAZAWA[2], Shunsuke KIKUCHI[1], Mitsuru ABO[2] ([1]Meiji Univ. Grad. school of Agri., [2]Meiji Univ. School of Agri.)

【背景・目的】　固着生活様式である高等植物の環境適応戦略は、興味深い学問領域であり、免疫応答機構を初めとする多くの研究がなされている。しかし、植物の環境変化に対する応答を人間が知るためには、植物の一部を切除し、成分の抽出や観察を行う必要がある。そこで我々は、低侵襲的に植物のストレス状態を把握する新たな手段を模索し、根端と外界との境界面に着目した。根端にはファイトアレキシンなどの二次代謝産物をはじめとする様々な滲出物や、ボーダーセル（BC）と呼ばれる根組織から脱離する生細胞が存在する。ストレス負荷時における滲出物の物質動態を分析し、さらに植物細胞モデルとして、BC の挙動を解析することで、個体としての植物のストレス応答を近似的に把握することが出来るのではないかと考えた。滲出物のなかでも、ストレスの初期応答物質のひとつである細胞外 ROS（exROS）を対象とし、前回報告した蛍光プローブ法[1)]によって分析した。BC の挙動解析にはストレス付与時の生存率計測を行った。以上の実験を行うことで、exROS 量動態と、BC 生存率に相関がないか検討した。
【方法及び結果】　分子内にニトロンを含む、turn on 型蛍光プローブ（FP）の合成は、Li らの既報に従い行った[2)]。芽生えダイズ（*Glycine max*）及びトウモロコシ（*Zea mays*）の根（4～5 cm）を 300 μM の FP を含む 1 mM の $CaCl_2$ 溶液に浸し、暗所湿空間で任意の時間インキュベートした。このインキュベート液の一部を HPLC の蛍光検出（Ex: 390 nm/Em: 490 nm）に供した。更に、NaCl などの環境ストレスや、キチンなどの病原菌ストレスのモデル化合物を植物根に付与した。BC の生死判定にはフルオレセインジアセテート（FDA）とプロピジウムイオダイド（PI）による二重染色を行い、細胞の観察及び撮影は蛍光ユニットを接続した実体顕微鏡で行った。細胞数の計測は、取得した画像データを Image J　ver 1.51 の粒子解析を利用して生存率を算出した。
　結果として、植物根に NaCl ストレスを負荷すると、BC 生存率が低下することが有意な差をもって観察された。exROS の分析および BC との相関性については現在調査中で、その結果を併せて報告する。

【参考文献】
1)　伊藤ら、日本農芸化学会関東支部 2017 年度支部大会要旨集　p22
2)　Li *et al*., *Anal*. *Chem*., 21, 4259-4302, 1997

ROS, border cell, root exudate

講演番号：2A29p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟北 A29 会場

根毛と種子を護る細胞壁タンパク質 SRPP の分子生理学的解析

Physiological function of the cell wall protein SRPP protecting root hairs and seeds

○鵜野 裕[1]、田中 奈月[1,2]、佐藤 良介[1]、前島 正義[1] ([1]名大院・生命農、[2]オックスフォード大)
○Hiroshi UNO[1], Natsuki TANAKA[1,2], Ryosuke SATO[1], Masayoshi MAESHIMA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Univ. of Oxford)

【背景・目的】

根毛機能の解明を、新規な無根毛株 NR23 を試料として進めてきた。その過程で、根毛が増大するリン酸欠乏時に根毛細胞で顕著に発現する新規タンパク質 SRPP（Seed and Root hair Protective Protein）が同定された。遺伝子欠損株 *srpp* を観察したところ、リン酸欠乏時に根毛が短く壊死しやすく、種子は萎縮し発芽率の低下を示した。SRPP は根毛と種子を護る働きをすると推定した。本研究は、特に種子に着目し SRPP の分子機能の解明を目的とする。その一環として、種子の発達過程の観察および相補株・過剰発現株における種子の表現型について解析した。

【方法】

srpp 株を試料として、鞘内の胚珠の発達を開花後の日数ごとに観察した。また、得られた種子を形状ごとに分け、発芽率を定量した。加えて、*srpp* 株に *SRPP* 遺伝子を胚・種皮・鞘で特異的に発現させた相補株を作製し、表現型・発芽率の回復を調べた。同様に野生株に *SRPP* 遺伝子を部位特異的に導入した過剰発現株を作製し、種子のストレス耐性を解析した。

【結果】

srpp の胚珠は発達の遅れがみられ、発達日数を経るごとに胚珠の形状に変形が見られた。このような胚珠の変形は、特に鞘内の先端側で多く観察された。*srpp* 株の形態異常の見られる種子では、形状に応じて発芽率が 20-40%程度にまで減少した。組織特異的な相補をした株では、表現型・発芽率の顕著な回復が見られた。しかし、35S、SRPP プロモーターで相補した植物体では完全回復が見られるのに対して、組織特異的な相補では、部分的な回復に留まっていた。この結果から、各組織に存在する SRPP が同調的に働くことで、正常な種子形成が達成される可能性が挙げられた。また、過剰発現株では熱処理を行った際の種子発芽率、すなわち種子の耐熱性が向上した。

SRPP が細胞壁に局在し、*srpp* 株では根毛・種子の細胞壁構造に異常が見られることも考慮すると、SRPP は細胞壁を強化することで、環境ストレスから根毛・種子を護る機能があると推測した。

seed, root hair, cell wall

発表責任者：鵜野 裕（uno.hiroshi@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A29p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟北 A29 会場

高等植物の二次肥厚を支える側方分裂組織の活性維持機構の解明
Regulatory mechanism of lateral meristems underlying radial thickening in *Arabidopsis thaliana*

○島田 由里菜、今村 美友、古川 博規、山篠 貴史（名古屋大生命農）
○Yurina SHIMADA, Miyu IMAMURA, Hiroki FURUKAWA, Takafumi YAMASHINO (Nagoya Univ.)

草本、木本の違いによらず単子葉を除く多くの種子植物の維管束組織は、その発生過程で二つの異なる成長様式が連携することにより成長・発達する。すなわち、最初に軸性器官の放射パターンが確立し、その結果生じた前形成層および内鞘に由来する細胞が分裂能を獲得して側方分裂組織を形成することにより中央–周辺軸方向へ肥厚成長（二次成長ともよばれる）する。二次成長は自身の器官を支えるのに必要な体軸の強度を担保しつつ、器官内および器官間の高次の維管束ネットワークを構築し、生涯を通じて維持するために重要な役割を果たしている。したがって、二次成長における細胞分裂活性の調節と分化運命の決定機構は、植物の体制構築・構造制御に密接に関連していると考えられる。サイトカイニンは、他のホルモンとともに細胞の分裂と分化の維持・調節に関与することが知られている。サイトカイニンに非感受性となる *arr1 arr10 arr12* 三重変異体では二次成長がまったく観察されないことから、サイトカイニン情報伝達は側方分裂組織の活性維持に必須の役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究ではサイトカイニン情報伝達を担う B 型 ARR 転写因子の下流で機能する遺伝子に着目し、シロイヌナズナの二次成長をモデルとして分裂組織の活性を維持する分子基盤を理解することを目的とした。その結果、LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN ファミリーに属するいくつかの転写制御因子がサイトカイニン初期応答因子として *CYCD3;1, ANT, WOX4* などの二次成長制御に関連した機能を担う後期応答遺伝子の発現を誘導することにより、側方分裂組織における細胞分裂活性を維持し二次成長を活性化する役割を担っていることを明らかにした。これらの結果を踏まえ本発表では、サイトカイニン情報伝達を介した二次成長の制御における、これら LBD 因子の生理的機能について議論したい。



図１ 軸性器官の二次肥厚を支えるCytokinin情報伝達経路

radial thickening, cytokinin, lateral meristems

発表責任者：山篠貴史（yamasino@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A29p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟北 A29 会場

植物時計の振動特性を支えるエピジェネティック制御機構の解析
Regulatory mechanism of chromatin modifications underlying robust circadian clock oscillation in plants
高田 祐輔、古川 博規、嶺野 雄登、今村 美友、○山篠 貴史（名古屋大農）
Yusuke TAKATA, Hiroki FURUKAWA, Yuto MINENO, Miyu IMAMURA, ○ Takafumi YAMASHINO (Nagoya Univ.)

多くの生物は 24 時間周期で変動する外界の環境変化に適応するために、概日リズムを生成する機構を獲得・進化させてきた。Pseudo Response Regulator (PRR) family は植物の概日時計システムを構成する主要な振動体としての役割を果たすことが知られている。PRR family に共通のレシーバー様ドメイン(RLD)は典型的な Response Regulator (RR)に存在するレシーバードメイン(RD)と一次配列の相同性が極めて高いため、RLD は RD を起源として進化したと考えられるが、もはや二成分系の情報伝達を担うドメインではなく、植物時計の振動機構に深く関与する新奇機能を獲得していると推定されている。しかしながら、RLD のドメイン機能については全くわかっていない。本研究では PRR に特異的かつ普遍的に保存された RLD の生理的機能を解明することを目的とした。シロイヌナズナの PRR7 全長と HA タグとの融合体 intact PRR7-HA と、その RLD を欠損させた PRR7ΔRLD-HA をそれぞれ PRR7 プロモーター支配下で発現するコンストラクトを *prr9 prr7 prr5* 三重変異体に導入した形質転換体を作製した。*prr9 prr7 prr5* は概日リズムを生成できず、遅咲き、長胚軸などの明瞭な時間情報伝達にかかる異常を示す。*prr9 prr5* 二重変異体は上記の形質が野生型に回復することが知られており、実際に intact PRR7-HA の導入は三重変異体の表現型を相補した。ところが、PRR7ΔRLD-HA は親株の異常形質 をいずれも相補することができなかった。したがって、RLD は PRR7 の中心振動体としての機能に必要なドメインであることがわかった。*PRR7* とともに振動ループを形成する *CCA1/LHY* の転写は暗期後半に誘導され、PRRs が発現する明期に抑制される。明期にホルムアルデヒド固定した形質転換体の核を抽出し、HA 抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験に供したところ、PRR7ΔRLD-HA は intact PRR7 と同様にターゲット遺伝子 *CCA1/LHY* のプロモーター上流約 300bp までの制御領域に特異的に結合することがわかった。よって、RLD は PRR7 の DNA 結合性に関与するドメインではないことが判明した。RLD が DNA 結合ではなく転写調節活性に関わることを明確にするために、ターゲットプロモーター近傍におけるクロマチン修飾に関して解析したところ、PRR7 は RLD に依存して *CCA1/LHY* のプロモーター近傍のヒストン脱アセチル化に関与していることが明らかになった。このことから、RLD は PRR の転写抑制因子としての活性に必須の機能ドメインであり、植物時計の強健な振動特性を支える背景には PRR によるエピゲノム修飾を介した日周性のクロマチンダイナミズム制御が重要な役割を果たしていることが考えられた。

Circadian clocks, Pseudo response regulators, Chromatin dynamism

発表責任者：山篠貴史（yamasino@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2B02a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B02 会場

Flavan 3-ols の代謝亢進作用の解明

Elucidation of metabolic enhancing effects induced by flavan 3-ols

○大矢 さとみ[1]、神野 将希[1]、難波 文男[2]、戸田 登志也[2]、越阪部 奈緒美[1]([1]芝工大 生命、[2]フジッコ株式会社)
○Satomi Oya[1], Masaki Kamino[1], Fumio Nanba[2], Toshiya Toda[2], Naomi Osakabe[1] ([1]Shibaura Institute of Tech.Bio-sci.Engineer, [2]Fujicco Co.,Ltd)

Flavan 3-ols(FL)を含む食品を摂取することで、メタボリックシンドロームのリスクファクターを改善することが知られている。しかし、FL は難吸収性であり、生体利用能は極めて低く、その作用メカニズムはいまだ不明である。これまでに ICR 系マウスにおいて、FL 単回経口投与後に血中 adrenaline(Ad)および noradrenaline(NA)濃度、また褐色脂肪組織(BAT)中の uncoupling protein 1(UCP-1) mRNA 発現量の有意な上昇が確認され、これらの変化は交感神経活動の亢進によって誘導されると考えられた 1)。今回、C57BL/6J マウスを用いて同様の効果を確認することを目的に、対照群として vehicle(V)群、FL10、100 mg/kg 投与群を設定して実験を行った。その結果、FL100 群において Ad および NA 濃度の有意な上昇がみられたが、UCP-1 mRNA 発現量に関しては、V 群と比較して FL 投与群に差異が認められなかった。また UCP-1mRNA の発現には、交感神経節後繊維末端から放出されたノルアドレナリンが、BAT 上のβ3 アドレナリン受容体に結合し、転写調節因子である PR domain zinc finger protein 16 (PRDM16) や Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator(PGC-1α)の発現量の上昇が必要であることが知られている。そこで転写因子である PGC-1α や PRDM16 の mRNA 発現量の定量を行った。しかしながら、これらの熱産生関連タンパク質においても差異は認められなかった。これらの結果から C57BL/6J 系統のマウスは ICR 系マウスと比較して FL に対する反応性に差異がある可能性が考えられた。次に、C57BL/6J 系統のマウスに対して FL の 3 日間反復投与実験を行った。実験群は Vehicle 群、FL 10 mg/kg 群、FL 50 mg/kg 群、FL 100 mg/kg 群とした。3 日間の反復投与 2 時間後に断頭採血および BAT の摘出を行い、単回投与実験と同様に分析を実施した。その結果、Vehicle 群と比較して FL 10 mg/kg 群、FL 50 mg/kg 群において UCP-1mRNA 発現量は有意に上昇した。一方、FL 100 mg/kg 群では UCP-1mRNA 発現量の上昇が見られなかった。以上により適量の FL は熱産生亢進作用を持つが、過剰量では熱産生中枢である縫線核にある抑制性α2 受容体の活性化を誘導することが示唆された。

1)Matsumura et al. PLoS One 2014.

Flavan 3-ols, UCP-1, Thermogenesis

発表責任者：越阪部奈緒美（nao-osa@sic.shibaura-it.ac.jp）

講演番号：2B02a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B02 会場

フラボノールによるグルコース取り込み促進効果には B 環のカテコール構造が重要である

Importance of catechol structure on B-ring of flavonols on promoting glucose uptake in muscle cells

○綾 恵弥、白鞘 大志、山下 陽子、芦田 均（神戸大院農）
○Megumi AYA, Daishi SHIRASAYA, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

【目的】イチゴなどに含まれるフラボノイドであるフィセチンは、筋肉細胞での糖輸送担体 4 型(GLUT4)の膜移行を介して細胞内へのグルコース取り込みを促進する。一方、フィセチンより B 環の水酸基が一つ多いロビネチンはグルコース取り込み促進効果を持たないことが報告されている。同様に、ケルセチンは筋肉細胞のグルコース取り込み促進効果が報告されているが、B 環の水酸基が一つ多いミリセチンはその効果についての報告がない。本研究では、これらの B 環水酸基の数の差異が糖取り込み促進効果の発揮へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】グルコース取り込み量は、化合物をラット骨格筋由来 L6 細胞に作用させ、酵素法により測定した。化合物の細胞への取り込み量は、L6 細胞に作用させた後、細胞破砕液から酢酸エチルで抽出し、HPLC にて測定した。GLUT4 の膜移行促進効果は、L6 細胞に化合物を作用させて膜画分を分画し、ウェスタンブロッティングにて検討した。フラボノールは自家蛍光を示すため、化合物を細胞に作用させて蛍光顕微鏡で細胞への取り込みを観察した。また、蛍光強度を経時的に測定することで、化合物の存在量の変化を評価した。動物実験においては、経口糖負荷試験を行うことで血糖値の上昇抑制効果を調べた。
【結果・考察】 フィセチンは濃度依存的にグルコース取り込みを促進したが、ロビネチンでは促進効果が見られなかった。また、フィセチンは GLUT4 の膜移行を促進することが確認されたが、ロビネチンは促進しなかった。B 環にフィセチンやロビネチンと同様の差異を持つケルセチンとミリセチンを作用させた際にも、水酸基を 2 つ持つケルセチンは糖取り込みを促進し、3 つ持つミリセチンは促進しなかった。これに対し、ロビネチンの構造類似化合物である 3,7-dihydroxy-3’,4’,5’-trimethoxyflavone では有意なグルコース取り込み促進効果が見られた。細胞内および培地中での化合物量を測定したところ、フィセチンは細胞に取り込まれたが、ロビネチンは細胞と培地のいずれからもほとんど検出されなかった。蛍光顕微鏡観察においても、フィセチンは細胞内で蛍光が観察されたのに対し、ロビネチンではほとんど蛍光が観察されなかった。従って、ロビネチンは酸化分解されたのではないかと考えた。そこで、アスコルビン酸を添加したところ、ロビネチンの蛍光の減衰速度が小さくなり、細胞へのロビネチンの取り込み量が大幅に増加したが、グルコース取り込み促進効果は依然として見られなかった。以上より、ロビネチン は B 環 5’位に水酸基が存在することによって酸化分解され易くなっているが、細胞内へ取り込まれてもグルコース取り込み促進効果を持たないことが明らかとなった。フィセチンとロビネチンをマウスに経口投与したところ、フィセチンはグルコース負荷による血糖値の上昇を有意に抑制したが、ロビネチンは抑制しなかったことから、*in vivo* においてもこれら二つの化合物による機能の発揮に差異が認められた。
本研究は文部科学省科研費 17H00818 の助成を受けたものです。

flavonol, catechol structure, glucose uptake

講演番号：2B02a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B02 会場

Kaempferol ameliorates glucose uptake via AMPK- and JAK/STAT-pathways in L6 myotubes

○Hao Jiang, Yasukiyo Yoshioka, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida (Kobe Univ.)

[Purposes] Diabetes mellitus, an important global health issue, is usually accompanied by insulin resistance. Muscle is an important tissue to maintain the blood glucose level. Translocation of glucose transporter 4 (GLUT4) to the plasma membrane plays a crucial role in the maintaining postparndial blood glucose level. It is known that kaempferol possesses various health beneficial effects. However, the effect of kaempferol on the prevention of hyperglycemia is unclear yet. A purpose of this study is to investigate whether kaempferol promotes glucose uptake via GLUT4 translocation in L6 myotubes.

[Methods] This study elucidates the mechanism underlying effect of kaempferol on glucose uptake and translocation of GLUT4. To assess the effect on glucose uptake, 2-deoxy-(^{3}H)-glucose uptake in L6 myotubes was examined at different concentrations of kaempferol. Then, translocation level of GLUT4 and its related signaling molecules were assessed in the L6 myotubes treated with kaempferol at various concentrations for 15 min with or without small interfering RNA. The cell lysate and plasma membrane fraction were prepared and subjected to the western boltting and immunoprecipitation to charify the mechanism of translocation of GLUT4 through insulin-, AMPK- and JAK/STAT-pathways.

[Results] Kaempferol significantly increased glucose uptake accompanied by translocation of GLUT4 to the plasma membrane at concentration-independent manner: 1nM at low concentration and 1μM at high concentration showed the significant effects. Kaempferol induced the phosphorylation of IRS-1/PI3K without stimulating the phosphorylation of insulin receptor. In addition, kaempferol accelerated the phosphorylation of AMPK, ACC, JAK-2 and STAT-3. These results were verified by the small interfering RNA as well, and received the similar results, kaempferol stimulated translocation of GLUT4 was abolished after involving the small interfering RNA of AMPK and JAK-2. Taken together these results, we concluded that 1nM and 1μM kaempferol increased glucose uptake accompanied by translocation of GLUT4, mainly activated AMPK- and JAK/STAT-pathway. Thus, kaempferol is an effective compound for prevention of hyperglycemia through ameliorating glucose uptake and GLUT4 translocation.

* This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) 17H00818 (H.A., Y.Ya.).

Kaempferol, GLUT4, AMPK

講演番号：2B02a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B02 会場

筋肉細胞において GLUT4 の細胞膜移行を促進させる EGCg の標的分子探索

Search for target molecules of EGCg that promote GLUT4 translocation in muscle cells

○池田 真規、芦田 均 (神戸大院農)
○Masaki IKEDA, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

【目的】茶カテキンであるエピガロカテキンガレート(EGCg)は、筋肉細胞において糖輸送担体 4 型(GLUT4)の細胞膜移行を介して高血糖予防効果を持つことが報告されている。これまでに、われわれはラット骨格筋由来 L6 筋管細胞において EGCg 誘導性の GLUT4 細胞膜移行には、インスリンシグナル伝達経路である PI3K や運動刺激により活性化する AMPK が関与していることを明らかにしてきた。しかし、上流の標的分子は未だ不明である。そこで本研究は、筋肉細胞における GLUT4 の細胞膜移行を促進させる EGCg の標的分子探索を目的とした。
【方法】EGCg とタンパク質との結合ならびに結合の強弱を評価するために、酸化還元反応を利用したレドックスサイクル染色法を用いた。L6 細胞ならびにラットより摘出した骨格筋組織を用いて細胞膜画分を分画した後、EGCg (5 μM−500 μM) を 15 分間作用させ、レドックスサイクル染色を行った。染色された位置のバンドをゲルから切り出し、タンパク質をトリプシン消化し、質量分析計 (LC−MS/MS) に供することで、MASCOT 解析を行い、標的候補分子の同定を試みた。また、別の方法としてエポキシビーズに EGCg とネガティブコントロールとして(+)−C を結合させたプローブを作製し、pull down assay を行い、標的候補分子の同定を試みた。次に、検出されたタンパク質を siRNA を用いてノックダウンし、酵素法を用いて糖取り込み活性測定を行った。また、GLUT4 の細胞膜移行に及ぼす影響を western blotting を用いて検討した。
【結果・考察】染色された位置のバンドをゲルから切り出し MASCOT 解析に供したところ、レドックスサイクル染色法からは 787 のタンパク質が、EGCg 結合ビーズを用いた pull down assay からは、102 のタンパク質が検出された。また両方法で 45 kDa 付近に creatine kinase M−type が検出され、その protein sequence coverage はレドックスサイクル染色では 67%、pull down assay では 46%であった。そこで、siRNA を用いて creatine kinase M−type をノックダウンしたところ、EGCg による糖取り込み活性の有意な上昇がキャンセルされた。また、GLUT4 の細胞膜移行においても検討を行ったところ、creatine kinase M−type をノックダウンすることにより EGCg による有意な促進がキャンセルされた。以上の結果より、MASCOT 解析で検出された creatine kinase M−type は、GLUT4 の細胞膜移行を介した EGCg 誘導性糖取り込みの標的分子であることが明らかになった。

target molecule, epigallocatechin-3-gallate, creatine kinase

講演番号：2B02a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B02 会場

フラボノイド Chrysin による SREBP を介した脂質合成抑制効果の解析
Chrysin attenuates lipogenesis via inhibiting SREBP activity.
○岩瀬 将盛、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科応生化）
○Masamori IWASE, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichirou SATO (The University of Tokyo)

【目的】
Sterol regulatory element-binding protein(SREBP)は生体内の脂質代謝を包括的に制御する転写因子で、SREBP 活性の上昇は脂肪酸合成やコレステロール合成促進につながることが知られている。SREBP は小胞体膜上に前駆体として合成され、プロセシングを受けることで成熟型となり、核内に移行して転写因子として機能する。SREBP 活性の抑制は食餌性肥満マウスや 2 型糖尿病マウスの体重増加や脂肪肝を抑制することが報告されており、生活習慣病改善のターゲットとして期待される。そこで我々は、SREBP 活性を抑制する食品成分を探索し、ヒラタケや蜂の巣に含まれる Chrysin というフラボノイドが、SREBP 標的遺伝子の発現及び、細胞の新規脂質合成を抑制することを昨年大会で報告した。本研究では、Chrysin による SREBP 活性抑制の作用機序の解明を目的とした。
【方法】
Chrysin が及ぼす内因性 SREBP タンパク質への影響を調べるため、ヒト肝がん由来細胞 HuH-7 細胞に Chrysin を処理した時の内因性 SREBP タンパク質レベルを Western blotting により確認した。また、HuH-7 細胞に外因性成熟型 SREBP1c を過剰発現させた際の、FAS promoter 活性および、外因性成熟型 SREBP1c の遺伝子発現とタンパク質レベルを確認することで、成熟型 SREBP への影響について検討を行った。
【結果】
Chrysin を HuH-7 細胞に処理すると、前駆体 SREBP タンパク質量は低下せず、成熟型 SREBP タンパク質量のみ低下した。また、外因性成熟型 SREBP1c を過剰発現させた際の Chrysin の効果を確認したところ、外因性成熟型 SREBP1c タンパク質量と FAS 遺伝子 promoter 活性はともに低下しており、この時、外因性成熟型 SREBP1c の遺伝子発現は低下しないことが明らかになった。これらの実験より、Chrysin は成熟型 SREBP タンパク質に作用して、そのタンパク質量を低下させ、標的遺伝子の発現を低下させることが明らかになり、Chrysin は成熟型 SREBP のタンパク質分解を亢進することが示唆された。成熟型 SREBP の分解経路の一つとして、ユビキチン・プロテアソーム系が挙げられるが、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理条件においても、Chrysin による成熟型 SREBP 分解の亢進が確認できた。このことから、Chrysin による成熟型 SREBP 分解におけるユビキチン・プロテアソーム系の寄与はわずかなものだと考えられる。他の分解経路については現在検討中である。

SREBP, lipid metabolism, flavonoid

講演番号：2B02a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B02 会場

貧血を伴わない鉄欠乏状態と高ショ糖食摂取の組み合わせによる肝臓脂質蓄積
High sucrose diet with marginal iron deficiency promotes lipid accumulation in the liver
○堀 将太[1]、常木 生也[1]、花井 健人[1]、清水 英寿[2]、原 博[1]、石塚 敏[1]([1]北大・院農、[2]島根大・生資)
○Shota HORI[1], Ikuya Tsuneki[1], Taketo Hanai[1], Hidehisa Shimizu[2], Hiroshi Hara[1], Satoshi Ishizuka[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Shimane Univ.)

背景と目的：貧血を伴った重度の鉄欠乏を対象とした研究は広く行われている。一方で、より発症頻度が高い貧血を伴わない軽度の鉄欠乏状態を対象とした研究はほとんど行われていない。これまでに我々は、非アルコール性脂肪肝（NAFLD）患者の血中で増加することが報告されている胆汁酸をラットに投与することで、肝臓脂質蓄積が誘導されることを見出している。その際、肝臓鉄が低下し、肝臓鉄の低下が肝臓トリグリセリド（TG）蓄積と明確な負の相関を持つことを明らかにした。ここで観察される肝臓鉄の低下は、血漿鉄濃度が低下するのみで、血中ヘモグロビン濃度に全く変動は観察されない。すなわち、貧血を伴わない軽度の鉄欠乏状態が肝臓 TG 蓄積を誘導する可能性を示している。本研究は日常生活で誰もが陥り得る、貧血を伴わない軽度の鉄欠乏状態が肝臓 TG 蓄積に与える影響を明らかにすることを目的として行った。
方法：Wistar 雄性ラットに AIN93G 準拠の鉄充足食、鉄充足食の鉄量を 2 分の 1 に減らした軽度鉄欠食、鉄を除いた完全鉄欠乏食を与えた 3 群を 3 週間飼育し、鉄関連パラメータ及び肝臓 TG を測定した。また、鉄充足食および軽度鉄欠乏食の糖源を砂糖（HS）に置き換えた糖過剰下における試験を実施し、同様の解析を行った。
結果と考察：完全鉄欠乏食を与えたラットにおいては、貧血を伴った重篤な鉄欠乏状態に陥るとともに、飼育 10 日目を境に体重減少および摂食量の低下が観察された。その一方で、軽度鉄欠乏食を摂取したラットにおいては血漿鉄濃度および肝臓鉄濃度のみが有意に低下し、血中ヘモグロビン濃度および体重・摂食量の低下は起きなかった。すなわち、軽度鉄欠乏食の摂取により貧血を伴わない軽度鉄欠乏状態を誘導することに成功した。しかしながら、肝臓中 TG に明確な増加は観察されず、軽度の鉄欠乏状態単独では肝臓脂質蓄積に不十分であることが判明した。一方で、高砂糖食を摂取させたラットにおいて軽度鉄欠乏状態を誘導したところ、高砂糖食を単独で摂取したラットに比べて肝臓 TG 蓄積が有意に増大した。すなわち、軽度の鉄欠乏は西欧食の特徴の 1 つである糖過剰下において、糖からの脂質合成を促進することで肝臓 TG 蓄積をもたらす機構が予想された。今後はこれらの糖過剰＋軽度鉄欠乏ラットにおける肝臓の TG 合成に関連する遺伝子発現を解析する予定である。

Bile acid, NAFLD, Iron deficiency

発表責任者：堀将太（horisho@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B02a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B02 会場

脂肪性肝疾患モデルへのタウリン摂取の影響
Influence of taurine treatment in fatty liver disease model
○宮田 昌明、舩木 萌浩、福原 千晶、住屋 佑希乃、杉浦 義正 (水大校食品)
○Masaaki MIYATA, Akihiro FUNAKI, Chiaki FUKUHARA, Yukino SUMIYA, Yoshimasa SUGIURA (National Fisheries Univ.)

【目的】タウリンは含硫アミノ酸で生体内に最も豊富に存在する遊離アミノ酸である。一部体内で合成されるがタコ、イカ、カキなどの魚介類に多く含まれ、多くは食事により摂取され体内に取り込まれる。タウリンは多くの生理作用を有するが、特に肝機能の改善作用が注目されドリンク剤等に利用されている。近年成人に脂肪肝を伴う非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)が多く認められ、その予防、改善に注目が集まっている。本研究では肝臓に脂肪が蓄積し、肝機能障害が認められ NAFLD のモデルと考えられる farnesoid X receptor (FXR)の欠損マウスを用いタウリン摂取による、病態への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】8〜10 週齢の雌性 *Fxr* 欠損マウスに 0%（コントロール）、0.5%と 2%のタウリン含有水を 4 週間にわたり摂取させた。肝臓、血液を採取し肝障害マーカーや脂質レベルを市販キットで測定した。胆汁酸組成は 3α-hydroxysteroid dehydrogenase カラムを用いた HPLC で測定した。肝臓の mRNA レベルの測定は、定量 PCR で実施した。
【結果と考察】タウリン摂取群（0.5%と 2%）において肝内 triglyceride(TG)、free fatty acid (FFA)レベルと血清中 TG レベルの有意な低下が認められた。一方 total cholesterol レベルは減少傾向が認められた。肝障害マーカーの alanine aminotransferase、aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase 活性の有意な低下が、0.5%群で認められたが、2%群では認められなかった。肝内総胆汁酸レベルは 0.5%群で有意に低下し、taurocholic acid レベルの有意な減少が認められた。肝臓の重量は各群間で有意な差異は認められなかったが、肝/体重比では 2%群でコントロール群に比べ有意な高値を示した。肝臓の酸化ストレス関連遺伝子の heme oxygenase-1 や glutathione S-transferase alpha 1 の mRNA レベルはコントロール群に比べ 0.5%群のみで減少が認められた。これらの結果は、タウリンが *Fxr* 欠損マウスの脂質代謝異常を改善するとともに肝機能障害を軽減するが、高濃度の摂取はこれらの効果を消失させる可能性を示した。

taurine, NAFLD, FXR

発表責任者：宮田昌明（mmiyata@fish-u.ac.jp）

講演番号：2B02a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B02 会場

Study on food factors that regulate bile acid metabolism

○Tzuwen HONG, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

Bile acids (BA) are the fundamental constituents in the bile. Their biosynthesis occurs in the liver as a result of cholesterol catabolism. In the ileum, BA are transported into the enterocyte by the ileal bile acid transporter (IBAT; SLC10A2) and then are exported into portal vein. In liver, BA are re-taken up by the Na+ tauocholate cotransporting polypeptide (NTCP; SLC10A1). The crucial roles of bile acids as emulsifiers to facilitate lipids digestion has long been recognized. More recently, bile acids also have been identified as signaling compounds for several nuclear receptors and membrane G protein coupled receptor like TGR5, and consequently regulates not only BA metabolism but also energy homeostasis and glucose metabolism. Accordingly, BA and their transporters have been studied widely as therapeutic targets, and several approaches to increased BA concentration in circulation have been reported with benefits on improving metabolic syndromes. However, the synthetic compounds administration sometimes with the risk of dislikable side effects. Thus, the alternative treatment with less or no complications is still in demand.

In this study, we aimed to screen the potential food factors that inhibit NTCP-mediated BA uptake. We found out the food factor X among 156 kinds of food compounds in library, which decreases BA transport into hepatocyte using stable HepG2 cells expressed flag-tagged hNTCP. The underlying mechanisms were examined in transcriptional and translational level. Furthermore, 28 days animal study provided evidences that the treatment of NTCP nature inhibitor led to the amelioration of body weight with decreased cholesterol level and increased bile acid concentration in the circulation.

We here propose that moderately inhibition of NTCP mediated bile acid reuptake by food factors could enlarge the BA pool size and improve lipid, glucose and energy homeostasis, which therefore provide a potentially therapeutic targets in prevention and treatment of metabolic syndromes.

Bile acid, cholesterol metabolism, energy expenditure

講演番号：2B02a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B02 会場

生理的濃度における pyrroloquinoline quinone（PQQ）のミトコンドリア新生促進作用の解析

Analysis of mitochondrial biogenesis by pyrroloquinoline quinone (PQQ) at physiologically-relevant concentrations

○小川 満利子[1]、才原 一浩[2]、池本 一人[3]、内田 浩二[4]、赤川 貢[2]([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大院・生命環境、[3]三菱ガス化学（株）、[4]東大院・農学生命)
○ Mariko OGAWA[1], Kazuhiro SAIHARA[2], Kazuto IKEMOTO[3], Koji UCHIDA[4], Mitsugu AKAGAWA[2] ([1]College of Life & Environ. Adv. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., [4]Grad. Sch. of Agric. & Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】 Pyrroloquinoline quinone（PQQ）は，ニコチンアミドとフラビンに次ぐ第 3 の酸化還元補酵素として発見された o-キノン化合物であり，幅広い食品中に微量に含有されている．PQQ 欠乏餌で飼育したマウスにおいて，生育不良や毛並みの悪化，皮膚の脆弱化，ミトコンドリア量の減少等の欠乏症状が観察されるため，PQQ は哺乳動物の必須微量栄養素である可能性が示唆されている．しかし，PQQ の生理作用とその作用機構は十分には解明されていない．そこで本研究では，皮膚由来の線維芽細胞，脂肪様細胞，および肝細胞を用いて PQQ のミトコンドリア新生促進作用を検証し，その分子機構の解明を目的とした．
【方法】 PQQ 含有培地でそれぞれの細胞を培養後，ミトコンドリアの蛍光染色，ミトコンドリアマーカー（MTCO1）及びミトコンドリア DNA の解析を行うことで，ミトコンドリア量を評価した．また，ミトコンドリア新生を促進する転写共役因子である PGC1α の細胞内局在をウェスタンブロット法と免疫蛍光細胞染色法により解析した．さらに，NAD^+依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 よって活性化される PGC1α のアセチル化レベルをウェスタンブロット法で評価した．
【結果】 生理的濃度（～100 nM）の PQQ を含有する培地でマウス由来 NIH/3T3 線維芽細胞を培養した結果，PQQ 濃度依存的なミトコンドリア量の増加，及びミトコンドリア脱水素酵素活性の上昇と ATP 産生の亢進が確認された．また，PGC1α の細胞内局在を調べたところ，PQQ 濃度依存的な核内移行の促進が観察され，その転写産物でありミトコンドリア遺伝子の発現を促進する転写因子 NRF1 と Tfam の mRNA 発現レベルの上昇が認められた．そこで，PGC1α のアセチル化レベルを解析したところ，有意に減少することが明らかになった．一方，SIRT1 阻害剤（EX-527）の共存下では PQQ によるミトコンドリア新生の促進と PGC1α の核内移行が顕著に抑制された．SIRT1 は細胞内 NAD^+依存的に活性化するが，PQQ は自身の強い酸化還元能によって NADH を NAD^+に酸化することが報告されている．そこで，細胞内 NAD^+の定量を行ったところ，PQQ 濃度依存的な細胞内 NAD^+量の増加が判明した．また，PQQ がマウス由来 3T3-L1 脂肪様細胞およびヒト由来 HepG2 肝細胞のミトコンドリア新生を促進することを明らかにした．
【結論】 PQQ は細胞内 NAD^+濃度を上昇させることで SIRT1 を活性化し，PGC1α の核内移行を介してミトコンドリア新生を促進する分子機構が推定された．

pyrroloquinoline quinone (PQQ), mitochondrial biogenesis, NAD^+

講演番号：2B02a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B02 会場

Kinase 阻害剤がミトコンドリア生合成に及ぼす作用

The effect of Kinase inhibitor on mitochondrial biogenesis

望月 祐介[1]、○守田 昭仁[1]、竹内 彩夏[1]、長池 祐太[1]、小郷 尚久[1]、浅井 章良[1]、亀井 康富[2]、三浦 進司[2] ([1]静岡県立大学、[2]京都府立大学)
Yusuke Mochizuki[1], ○Akihito Morita[1], Ayaka Takeuchi[1], Yuta Nagaike[1], Naohisa Ogou[1], Akira Asai[1], Yasutomi Kamei[2], Shinji Miura[2] ([1]University of Shizuoka, [2]Kyoto Prefectural University)

【背景・目的】

高齢者の骨格筋機能の向上は重大な課題である。持久運動により発現量が増加する転写共役因子 PGC-1α は、ミトコンドリア生合成の促進、脂肪酸酸化促進、筋線維タイプの変化等に寄与し、筋持久力の向上に関わる。即ち、PGC-1α を活性化できれば、高齢者の筋機能向上が期待できる。本研究では、PGC-1α を活性化する化合物を、270 種類の Protein kinase inhibitor を収録した Kinase inhibitor screening library(KIS library)から探索し、陽性化合物のミトコンドリア生合成促進作用を解析した。

【方法】

(1)たんぱく質間相互作用を調べる手法である Two-hybrid 法を応用して、PGC-1α、ルシフェラーゼを各々組み込んだ発現ベクターを HEK293T に導入し、各種化合物存在下で 24 時間培養後のルシフェラーゼ活性を測定した。(2)C2C12 筋管細胞を、(1)の実験で陽性と判定された化合物存在下で 48 時間培養後、MitoTracker を用いてミトコンドリアを可視化し、蛍光強度を測定することでミトコンドリア量の変動を評価した。さらにミトコンドリアマーカーであるクエン酸生合成酵素（CS）活性、ミトコンドリア DNA コピー数の変動を測定した。(3) C2C12 筋管細胞を、(1)の実験で陽性と判定された化合物存在下で 24 時間培養後、PGC-1α 標的遺伝子でミトコンドリア生合成に関与する Nrf1、Nrf2、ERRα 等の遺伝子発現量の変化を解析した。

【結果】

(1)既知の PGC-1α 活性化剤である AICAR が PGC-1α を活性化したことからスクリーニング系が正常に機能している事を確認した。同様のスクリーニング系により、KIS library から 5 種類の化合物（KIS-204, 200, 205, 142, 256）が PGC-1α を活性化する陽性化合物として見出された。(2)5 種類の陽性化合物のうち KIS-204, 200, 205 存在下が C2C12 筋管細胞で、MitoTracker の蛍光強度を増加させた。さらに、KIS-205 によって CS 活性、ミトコンドリア DNA コピー数が増加した。(3)KIS-205 存在下で培養した C2C12 筋管細胞で Nrf1,Nrf2 の遺伝子発現量が増加した。

【結論】

KIS-205 は骨格筋細胞において PGC-1α 活性化を介して、ミトコンドリア生合成の促進に寄与することが示唆された。現在、マウスを用いて、KIS-205 が筋持久力を向上させるかを検討している。

PGC-1α, mitochondrial biogenesis, skeletal muscle

発表責任者：守田昭仁（moritaa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2B02a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B02 会場

遊離脂肪酸受容体を活性化する食品成分の探索
Activation of free fatty acid receptors by food components.
○下村 沙也子[1]、井上 飛鳥[2]、青木 淳賢[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1]([1]名大院生命農、[2]東北大院薬、[3]東大院農学生命)
○Sayako SHIMOMURA[1], Asuka INOUE[2], Junken AOKI[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1]
([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Tokyo Univ.)

【目的】
我が国における糖尿病有病者は 1000 万人を超えており、その数は年々増加する傾向にある。また、その重篤な合併症から死に至る場合も多く、糖尿病の改善および治療に関する有用な方法の探索は急務である。近年、オーファン G タンパク質共役型受容体（GPCR）のリガンド探索から複数の遊離脂肪酸受容体（FFAR）の存在が明らかとなった。このうち、中鎖および長鎖脂肪酸をリガンドとする FFAR 1 と FFAR 4 は、血糖値依存的なインスリン分泌の増強に関与していることから、その活性化は 2 型糖尿病の改善および治療に有用であることが示唆されている。そこで本研究では、食品成分の中から FFAR を活性化する物質を探索することを目的とし、今回は特にハーブおよびスパイスに着目して研究を行った。
【方法・結果】
19 種類のハーブおよびスパイスの溶媒抽出物について、GPCR の活性化を高感度かつ高精度に検出するトランスフォーミング増殖因子α（TGFα）切断アッセイを利用し、FFAR1 および FFAR4 に対する活性化能を評価した。その結果、ローズマリーのヘキサン抽出画分が FFAR1 および FFAR4 に対して高い活性を示すことが判明した。また、この活性は濃度依存的に上昇することも確認された。続いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いてローズマリーのヘキサン抽出画分を分画し、同様のアッセイを行った。その結果、複数の画分が FFAR1 および FFAR4 に対して高い活性を示すことが判明したことから、ローズマリー中には FFAR1 および FFAR4 を活性化させる複数の物質が含まれていることが示唆された。現在、ローズマリーに含まれる活性成分の単離・精製を進め、質量分析や NMR を用いた構造解析を行っている。

GPCR, Free fatty acid receptor, Diabetes

講演番号：2B02a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B02 会場

鰹出汁摂取による血中アディポネクチン濃度の上昇

Enhanced Blood Adiponectin Level by Ingestion of Dried-bonito Broth in Humans

○住澤 知之（鹿児島女子短大食物栄養）
○Tomoyuki SUMIZAWA (Kagoshima Women's College)

本研究者は、予備的な研究により、毎食前の鰹本枯れ節より抽出した出汁の摂取が血中アディポネクチン量の増加と相関する可能性を見出した。アディポネクチンは、インスリン感受性の亢進などの作用が言われているため、糖尿病などの生活習慣病の予防に働く善玉ホルモンと考えられている。そこで、本研究は指宿市の全面的な協力を得て、指宿市「地域食材の健康に及ぼす機能性効果研究委託事業」として、指宿市在住の特定健康診査対象者 60 名（男性 11 名、女性 49 名）で検証を行った。約 3g ずつ紙パックに詰められた指宿市山川産の鰹本枯れ節粉砕物を 1 回分として、これより熱湯約 100ml にて約 1 分間出汁を抽出してもらい、それを毎食前に飲用してもらった。摂取期間は平成 27 年 8 月 3 日～10 月 3 日の 62 日間と、その後、12 月 6 日までの 64 日間の非摂取期間をはさみ、再度 12 月 7 日～平成 28 年 2 月 6 日までの 62 日間の 2 回とした。各摂取期間の前後には、身長、体重及び腹囲の計測と体組成測定及び血液検査のための採血を実施した。解析は、開始後に慢性疾患の投薬治療のため辞退を申し出た 1 名と、鰹出汁飲用記録で、摂取期間中の飲用回数が、全飲用回数の 80%未満だった 5 名を除く、計 54 名（男性 10 名：40 歳～67 歳、女性 44 名：39 歳～64 歳）のデータを用いて行った。その結果、血清中のアディポネクチン値は、2 回の鰹出汁摂取期間とも有意に上昇していたが、それ以外の検査項目については、鰹出汁の摂取と各検査値の増減の間に、相関性が見られた項目はなかった。一方で、鰹出汁非摂取期間において、血液中のアディポネクチン濃度の低下は見られなかった。本枯れ節由来の鰹出汁摂取により血液中のアディポネクチンが増加することについては、さらなる検討の余地はあるものの、その可能性は高いと考えられた。なお、予備的な検証では、鰹出汁中に含まれる抗酸化活性を有するイミダゾールジペプチド、アンセリン（β-alanyl-3-methyl-L-histidine）は、ヒト血清中のアディポネクチンレベルの増加に関与する可能性は低いと考えられた。そのため、今後は、ヒトにおけるアディポネクチンの分泌亢進に働く、鰹出汁中の機能性成分の同定を行っていく必要もある。

Dried-bonito Broth, Adiponectin, Anserine

発表責任者：住澤知之（tsmzw@jkajyo.ac.jp）

講演番号：2B02a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B02 会場

ピペリンは ROS を介して AMPK を活性化しグルコース取り込みを促進する

Piperine enhances glucose uptake through ROS generation that resulted in the activation of AMPK signaling pathway.

○前田 歩海[1]、吉岡 泰淳[2]、山下 陽子[1]、芦田 均[1]([1]神戸大院・農、[2]神戸大院・科技イノベ)
○Ayumi MAEDA[1], Yasukiyo YOSHIOKA[2], Yoko YAMASHITA[1], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

【目的】生体内の血糖調節において重要な組織は筋肉であり、インスリン応答によるグルコースの取り込みの約 75%は筋肉が担っている。インスリンがインスリン受容体に結合すると protein kinase B/AKT 等の下流のシグナル分子が活性化され、細胞内小胞に存在するグルコース輸送体 (GLUT4) が細胞膜へ移行することでグルコースの取り込みが促進される。GLUT4 は、インスリン非依存的に運動や筋収縮による 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性化によっても細胞膜へ移行する。本研究では、これまでに L6 筋管細胞においてグルコース取り込みを促進することが認められたペッパーの辛味成分であるピペリンに着目し、その作用機序を解明することを目的とした。
【方法】L6 筋管細胞にピペリンを作用させ、$DCFH_2$-DA を用いて reactive oxygen species (ROS) 産生を測定した。細胞内 Ca^{2+}は蛍光プローブである Fluo-8 を用いて観察した。シグナル経路の各因子に与える影響はウェスタンブロッティングによって検証した。ICR マウスを用いてグルコース負荷試験を行うことで血糖値上昇抑制効果を調べた。
【結果】マウスにピペリン（0.01、0.1 mg/kg BW）を経口投与し、グルコース負荷試験を行ったところ、いずれの濃度においても有意な血糖上昇抑制効果が認められた。このとき、筋肉組織において GLUT4 の膜移行および AMPK のリン酸化が認められた。つぎに、L6 筋管細胞にピペリンを作用させたところ、GLUT4 の細胞膜移行が誘導された。その作用機序を検討したところ、ピペリンは，インスリンシグナル経路ではなく、AMPK シグナル経路を介してグルコース取り込みを促進することが判った。さらに、その上流因子について検証を行ったところ、ピペリンは細胞内 Ca^{2+}の上昇によって活性化される Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CAMKK) を介して AMPK を活性化させることが示唆された。ピペリンを作用させた筋管細胞において細胞内 Ca^{2+}の上昇が観察されたため、その要因が ROS 産生によるものであると仮定し測定したところ、ピペリンを作用させた筋管細胞において ROS の産生が認められた。また、ピペリンによる AMPK のリン酸化および細胞内 Ca^{2+}の上昇は、抗酸化物質である *N*-acetylcysteine によって阻害された。
【結論】ピペリンは ROS の産生を介して CAMKK/AMPK 経路を活性化し血糖調節に寄与することが示唆された。

Piperine, Glucose uptake, Reactive oxygen species

発表責任者：前田歩海（122a451a@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2B02a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟南 B02 会場

血糖調節機能を有する卵殻膜由来ペプチドの探索

Eggshell membrane peptide is a potential food source for blood glucose regulation

○高 越[1]、吉岡 泰淳[2]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大院科技イノベ)
○Yue GAO[1], Yasukiyo YOSHIOKA[2], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

【目的】
卵殻膜とは鶏卵の卵白と卵殻の間に薄膜であり、全卵重量の 0.9% を占めている。卵殻膜の主成分は繊維状のタンパク質で、人間の皮膚のアミノ酸組成と非常に類似している特徴を持っている。鶏卵が消費される中で、ほとんどの卵殻膜が不可食部として廃棄されている。そこで、本研究は卵殻膜の有効利用を目的として、卵殻膜由来ペプチドを用いて、生体内におけるグルコースの最大消費器官である筋肉を標的組織として、動物での糖負荷試験で高血糖予防効果を検証することと、培養筋管細胞でのグルコース取り込みを指標とした有効ペプチドの単離・精製を試みることを目的とした。
【方法】
キユーピー株式会社より分与された卵殻膜ペプチド（WP）を 3 kDa の限外濾過に供することで、卵殻膜低分子ペプチド画分（EMP）を得た。ICR 雄マウスを 14 時間絶食させた後、コントロール群、WP500、EMP250 および 500 投与群の 4 群に分け、WP を 500 mg/kgBW、あるいは EMP を 250 と 500 mg/kgBW となるように強制経口投与した。コントロール群には蒸留水を投与した。投与 1 時間後にグルコース溶液を 1 g/kgBW となるように経口投与し、糖負荷試験を実施した。また、ラット骨格筋由来 L6 筋管細胞に、各濃度の EMP を処理した後、細胞内へのグルコース取り込み量を測定した。EMP をイオン交換クロマトグラフィー（DEAE-650M, 30×325 mm）、ゲル濾過クロマトグラフィー（Biogel P-2, 20×225 mm）および高速液体クロマトグラフィー（HPLC; Aeris™ 5 µm PEPTIDE XB-C_{18}, 21.2×250 mm）に供し、有効ペプチドの単離・精製を行った。
【結果】
動物実験において、EMP の投与により血糖の上昇が有意に抑制されたが、WP は有効性を示さなかった。また、EMP は L6 筋管細胞において濃度依存的にグルコース取り込みを促進した。EMP をイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーに供し、有効ペプチドの精製を試みたところ、活性の有する Fr. I−II−VI を得た。このことから、Fr. I−II−VI にグルコース取り込みを促進させるペプチドが含有されることが強く示唆された。現在、Fr. I−II−VI に含まれる有効ペプチドの単離を行っている。
※本研究の一部は、平成 29 年度旗影会の特別助成により実施された。

eggshell membrane peptides, L6 myotubes, glucose uptake

講演番号：2B02a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟南 B02 会場

筋肉への糖取り込み促進効果を持つナツメグ抽出物中の関与成分の検討
Active compound in nutmeg extract promotes glucose uptake in myotubes
○河野 龍之進[1]、前田 歩海[1]、吉岡 泰淳[2]、山下 陽子[1]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大院科技イノベ)
○Ryunoshin KONO[1], Ayumi MAEDA[1], Yasukiyo YOSHIOKA[2], Yoko YAMASHITA[1], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Grad Sch Agri Sci, Kobe Univ, [2]Grad Sch Sci Technol Innov, Kobe Univ)

【目的】
生体内の血糖調節において筋肉は重要な組織であり、細胞内小胞にある糖輸送担体 4 型(GLUT4)が細胞膜に移行することで、グルコースを細胞内に輸送し血糖の調節を行っている。香辛料の一つであるナツメグは、主に肉料理の臭い消しとして広く用いられており、抗炎症作用や抗酸化作用などが報告されているが、グルコース取り込みに及ぼす効果についてはまだ十分に明らかになっていない。本研究では、骨格筋細胞においてグルコース取り込み促進効果が認められたナツメグ抽出物中の有効成分について検討した。
【方法】
筋肉へのグルコース取り込み促進効果を持つことが確認されたナツメグの熱水抽出後の残渣を 90% EtOH で抽出した画分（熱水 EtOH 抽出物）をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルで溶媒分配した。ラット骨格筋由来 L6 筋管細胞に、各分配画分を作用させ、細胞内グルコース取り込みに及ぼす影響を評価した。次に、効果が認められた画分について、HPLC で分画し、筋肉へのグルコース取り込み促進活性を指標に活性物質を単離・精製し、活性を調べた。活性物質の標品を L6 筋管細胞に作用させグルコース取り込み促進効果を検証した。GLUT4 膜移行に関わる因子の活性化はウエスタンブロッティングにより解析した。
【結果】
ナツメグの熱水 EtOH 抽出物を溶媒分配したところ、ヘキサン画分において、有意なグルコース取り込み上昇が見られた。また、HPLC を用いてヘキサン画分から分画した複数の化合物にグルコース取り込み促進効果が見られた。その１つのミリスチシンは、5’-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化を促進することが分かった。また、ミリスチシンは GLUT4 膜移行を促進することが分かった。
【結論】
ナツメグ抽出物中におけるグルコース取り込み促進効果を持つ有効成分の一つとしてミリスチシンを同定した。ミリスチシンは AMPK を活性化し、GLUT4 の膜移行を誘導することが示唆された。

glucose uptake, nutmeg, muscle

講演番号：2B03a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B03 会場

異なる植物油を用いた O/W エマルションの冷解凍に伴う不安定化挙動

Effect of vegetable oil type on dispersion stability of O/W emulsion during freezing and thawing processes

○遅沢 優大[1]、吉田 茉央[1]、宮川 弥生[1]、安達 修二[2]、谷 史人[1] ([1]京大院農、[2]京都学園大バイオ)
○Yudai CHIZAWA[1], Mao YOSHIDA[1], Yayoi MIYAGAWA[1], Shuji ADACHI[2], Humito TANI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】 O/W エマルションの形態の食品（マヨネーズなど）は，冷解凍を経ると油水の分離などの不安定化が起こり，品質が低下することがある．この不安定化は油相の結晶化に起因すると考えられているが，その詳細は不明である．油相の結晶化に伴い油水が分離する機構の解明は，冷解凍に伴う食品 O/W エマルションの不安定化を抑制する方法の提示につながることが期待される．そこで本研究では，結晶化挙動の異なる種々の植物油を用いて O/W エマルションを調製し，冷解凍に伴う不安定化挙動を検討し，その結果について考察した．

【方法】 種々の植物油（ベニバナ油，ナタネ油，オリーブ油，コメ油など）および Tween 20 水溶液を用いて，膜乳化によりメディアン径が約 3 μm の 50%（w/w）O/W エマルションを調製した．エマルション（1.5 mL）を−7～−35°C の所定の温度まで降温したのち，その温度で等温保持した．経時的にエマルションを取り出し，30°C で解凍したのち，5,200×g（g：重力加速度）で遠心分離した．分離した油相を取り除き，エマルションとして残存する油相の割合 X_{stable} を算出した．以前の検討 [1] と同様に，時間に対する X_{stable} の減少を誤差関数でフィッティングし，X_{stable} が減少を始めるまでの時間（不安定化の誘導期，$t_{\mathrm{i,d}}$）を算出した．また，熱電対を用いてエマルションおよび油相（植物油）の温度を経時的に測定した．等温保持を開始してから，油相の結晶化による発熱に起因する温度の上昇が見られるまでの時間を，結晶化の誘導期 $t_{\mathrm{i,t}}$ と定義した．

【結果】 油相の結晶化の誘導期 $t_{\mathrm{i,t}}$ および結晶化に伴う発熱ピークの形，すなわち，植物油の結晶化挙動は，油の種類に依存することを確認した．油相にベニバナ油を用いた場合，$t_{\mathrm{i,t}}$ と $t_{\mathrm{i,d}}$ はほぼ一致し，発熱が観察されるような巨視的な油相の結晶化とエマルションの不安定化が対応した．一方，油相にナタネ油を用いた場合には，$t_{\mathrm{i,t}}$ の方が $t_{\mathrm{i,d}}$ より短く，巨視的な油相の結晶化よりも先に，不安定化が進行する場合があった．これらの結果より，油相の巨視的な結晶化より以前に生じる，微小な変化もまた，冷解凍に伴うエマルションの不安定化に影響を及ぼす可能性が示唆された．この微小な変化は，植物油に含まれる融点の高い成分の結晶化と関連する可能性が示唆された．

1) K. Katsuki *et al*., *J. Food Sci.*, **82**(7), 1569-1573 (2017).

O/W emulsion, Vegetable oil, Crystallization

講演番号：2B03a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B03 会場

「さつま砂糖漬け鯛」製造法における味噌漬け処理の品質へ及ぼす影響
Effect of pickling process with *miso* on the quality of red sea bream pickled in *miso* and preserved in sugar
○福田 翼、内山 晃一、嵩 慎太郎、辰野 竜平、古下 学、前田 俊道（水産機構水産大）
○ Tsubasa FUKUDA, Koichi UCHIYAMA, Shintarou DAKE, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA, Toshimichi MAEDA (Natioal Fisheries Univ.)

【目的】さつま砂糖漬け鯛は、薩摩地方（鹿児島県）の保存食であり江戸時代の料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に記載されている。さつま砂糖漬け鯛は、三年味噌への漬け込み処理と味噌漬けした鯛の砂糖への漬け込み処理の二段階により製造される。文章中には「風を通さなければ長期保存が可能である」と記され、発酵が寄与しているものと推測される。水産発酵食品の場合、炭素源として米等を用いるが、砂糖を利用する例はない。これまでの研究により、三年味噌漬け処理後、砂糖への漬け込み処理により保存性や風味が向上する事を明らかとしてきた。本発表では、味噌漬け処理がさつま砂糖漬け鯛の保存性や風味に及ぼす影響を調査したので報告する。
【方法】さつま砂糖漬け鯛は、「鯛百珍料理秘密箱」を参考にして製造した。すなわち、まず、三枚におろしたマダイに魚肉重量に対して 5%の食塩を添加し、4˚C で一昼夜干した。干した魚肉を 1 cm 程度に切断した後、滅菌ガーゼに包み、味噌に漬け込んだ（4˚C、48 時間）。味噌漬け処理は、三年味噌、オートクレーブ処理（110˚C・20 分）三年味噌、現代の味噌製造法である速醸系味噌を用いた。さらに、味噌漬け工程を行わない無処理の魚肉を用いた。味噌漬け処理および無処理の魚肉を滅菌したガラス容器に入れ、魚肉重量に対して 20%の砂糖を添加し、容器を密封後、20˚C で 3 ヶ月目まで発酵させた。
【結果】発酵 0 日目（味噌漬け込み終了時）の水分含有量は、速醸系味噌（43%）、三年味噌（46%）、オートクレーブ処理三年味噌（52%）、無処理（61%）の順に低かった。発酵期間中の水分含有量は時間経過と共に減少したが、三年味噌、速醸系味噌、オートクレーブ処理三年味噌は 40%程度であったのに対し、無処理は 55%程度であった。発酵 0 日目の塩分濃度は、三年味噌速醸系味噌、オートクレーブ処理三年味噌は 5.7%程度であり、発酵 1 ヶ月目以降は 4.5%程度で安定していた。一方、無処理の場合、発酵 0 日目には 4.5%であり、発酵 1 ヶ月目以降は 3%程度で安定していた。発酵期間中の一般生菌数は、三年味噌および速醸系味噌では初発菌数である 10^3～10^4 CFU/g 程度で推移していた。一方、オートクレーブ処理三年味噌および味噌無添加の場合、発酵 1 ヶ月目には 10^7 CFU/g まで達していた。味噌漬け処理した魚肉中の塩分濃度は同程度であったことから、水分含有量における影響が強いものと示唆された。発酵期間中の魚肉の硬さは、三年味噌および速醸系味噌はオートクレーブ処理味噌および味噌無添加よりも増した。発酵 2 ヶ月目の試料を用いて官能評価を行った結果、三年味噌および速醸系味噌の方がオートクレーブ処理味噌や味噌無添加の場合よりも嗜好性評価が高かった。

traditional seafood, fermentation, food quality

発表責任者：福田　翼（tsubasa@fish-u.ac.jp）

講演番号：2B03a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B03 会場

日本水稲品種群における米胚乳酵素活性と炊飯米品質との関係

Relationship between endosperm enzyme activity and eating quality in Japanese rice cultivars.

○堀 清純[1]、飯島 健[1]、木村 圭一[2]、小俣 衣央梨[2]、仁木 沙都美[2]、江花 薫子[3]、鈴木 啓太郎[1]、辻井 良政[2]、高野 克己[3] ([1]農研機構作物開発センター、[2]東京農業大学、[3]農研機構遺伝資源センター)
○Kiyosumi HORI[1], Ken Iijima[1], Keiichi Kimura[2], Iori Omata[2], Satomi Niki[2], Kaworu Ebana[3], Keitaro Suzuki[1], Yoshimasa Tsujii[2], Katsumi Takano[3] ([1]Institute of Crop Science, NARO, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]Genetic Resources Center, NARO)

【目的】炊飯米の食味は日本の稲の育種における最も重要な選抜要因の一つであり、市場価格や消費者の評価を決定する重要な形質である。これまでに国内においても多数の水稲品種が育成されてきたが、その食味特性は品種によって大きく異なることが知られている。そこで本研究では、日本で育種選抜されてきた多数品種について、米胚乳中に存在する各種酵素活性を調査して食味との関係を明らかにすることを目的とした。
【試料および方法】日本水稲の遺伝資源系統および育成品種の合計 158 品種について、2 年間にわたり茨城県つくば市の試験圃場で栽培して成熟期に収穫した。精白米を粉砕して撹拌抽出した酵素液に、各酵素の合成基質を添加後 37℃にて酵素反応を行った。酵素反応停止後に吸光度を測定し、酵素活性量を計算した。酵素単位は、pH7.0, 37℃において 1 分間に 1 μmol の分解化合物を遊離させる力価を 1U とした。また、精白米のアミロースおよびタンパク質含有率を測定するとともに、少量カップ炊飯後に炊飯食味計による食味特性およびテンシプレッサーによる物理特性を評価した。
【結果】調査した全ての澱粉分解酵素および細胞壁多糖分解酵素において、大きな品種間差が観察された。α-amylase、β-amylase、α-gulcosidase、α-galactosidase、β-galactosidase、α-mannosidase、β-gulcanase およびβ-xylanase の酵素活性量は、育成品種と比較して在来品種では大きな値を示していた。Protease の酵素活性量は、在来品種と育成品種の間で同様の値であった。また、各種酵素活性量とアミロース含有率やタンパク質含有率との間には有意な相関関係は検出されず、炊飯食味計による食味値およびテンシプレッサーによる炊飯米の粘り値との間では、-0.2～-0.4 程度の有意な相関関係を検出した。調査した日本水稲品種群においては、全体的に澱粉分解酵素の活性量が低く細胞壁分解酵素活性の低い品種が炊飯米の食味値が高い傾向が観察された。本研究の結果から、胚乳中に存在する各種分解酵素の活性量の違いが、日本水稲品種の炊飯米の食味の品種間差の一部を説明していることが示唆された。本研究は、JSPS 科研費 JP16K07564 の助成を受けて実施した。

Endosperm enzyme, Eating quality, Rice

発表責任者：堀　清純（horikiyo@affrc.go.jp）

講演番号：2B03a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B03 会場

プラズマベースイオン注入法を用いた *Bacillus stearothermophilus* の殺菌におけるパルス幅の最適化

The optimization of pulse width on the sterilization of *Bacillus stearothermophilus* spores using plasma-based ion implantation

○角川 幸治[1]、薬師寺 亜耶[1]、山城 朱音[1]、水胤 友宏[2]、狩野 卓也[3]、田中 武[2]([1]広島工大生命、[2]広島工大院工学、[3]広島工大工学)
○Koji Kakugawa[1], Aya Yakushiji[1], Akane Yamashiro[1], Tomohiro Mizutane[2], Takuya Kano[3], Takeshi Tanaka[2] ([1]Hiroshima Inst. Tech. Life, [2]Hiroshima Inst. Tech. Grad. Eng., [3]Hiroshima Inst. Tech. Eng.)

【目的】食品の殺菌には、大きく分けて加熱殺菌法と非加熱殺菌法が存在する。一般的に、耐熱性芽胞の殺菌には、加圧加熱殺菌法が用いられているが、色調、香り、食感等に変化が起こることは避けることが出来ない。その為、耐熱性芽胞の殺菌にも適用できる非加熱殺菌法の開発が進められている。現在、我々は、非加熱殺菌法の一つであるプラズマイオンベースイオン注入(PBII)法を用いて耐熱性芽胞の殺菌を試みている。PBII 法は、処理槽が高温にならないため、食品への応用が期待されている。本研究では、フラットサワー型食中毒の原因菌として知られている *Bacillus stearothermophilus* の耐熱性芽胞をターゲットとし、PBII 法を適用する際のパルス幅の変更が殺菌効果に及ぼす影響について検討を行い、最適条件を見いだす事を目的とした。
【方法】*Bacillus stearothermophilus* を芽胞形成培地にて 55℃で 1 週間～2 週間培養し、芽胞を形成させた。採取した芽胞を洗浄した後、一定菌数となるよう希釈した。これを試験用芽胞液とした。次に、調整された芽胞液をプラズマ殺菌装置に投入し、ガス種 O_2、印可電圧-6kV、RF 電源 240VA、処理時間 10 分という条件の下で、周波数、ディレイ時間、パルス幅を変更しながら最適条件を見いだすべく処理を行った。その後、殺菌処理済みの芽胞液を培地に植菌し、55℃で 48 時間培養後、生残菌数を確認した。
【結果】まずは、PBII 処理における周波数の影響について調査を行った。処理周波数を 1Hz から 5Hz に変化させたが、殺菌効果に大きな違いは見られなかった。次に、ディレイ時間を 50μS から 250μS まで変化させた所、最も良い殺菌効果が見られたのは 50μS の時であり、およそ 4D の殺菌効果を得ることが出来た。最後に、パルス幅を 5μS から 20μS に変化させ、パルス幅が殺菌効果に与える影響を調査した。その結果、10μS の時に 5D の殺菌効果を得ることが出来た。現在は、PBII 法における殺菌効果のさらなる向上を目指し、研究を継続している。なお、本研究は、JSPS 科研費 JP16K07758 の助成を受けたものです。

Sterilization, Plasma-based ion implantation, Thermotolerant spore

発表責任者：角川幸治（k.kakugawa.db@it-hiroshima.ac.jp）

講演番号：2B03a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B03 会場

Visualizing metabolites in rice koji using MALDI imaging mass spectrometry

○Adinda Putri WISMAN, Eiichiro FUKUSAKI, Shuichi SHIMMA (Osaka Univ.)

Rice koji, which is made by inoculating *Aspergillus oryzae* on steamed rice, is one of the most important materials for Japanese sake production. As the first step in production, koji condition is thought to considerably influence sake quality. Koji quality check during sake production is usually done by experienced sake maker through observing the surface and structure. Visualization of compound distribution inside rice koji is required to understand the correlation between koji quality and its structure. However, the small size of koji makes it hard to partition the section, and distribution of potential metabolites related to quality cannot be seen with conventional methods such as GC-MS or LC-MS. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) is considered to overcome these problems. However, no attempts have been done to visualize constituents in koji or any solid fermented food. Therefore, it is important to develop suitable methods to perform non-targeted analysis of koji as novel application fields of MALDI-IMS.

Rice koji tissue is very fragile and tends to break when conventional sectioning method is used. Therefore, appropriate preparation techniques were considered to get adequate sample sections. In this study, we have explored several factors such as cutting temperature and section thickness, as well as aiding tools that can facilitate smooth sectioning. We found that cutting in freezing temperature and cryoembedment helped in maintaining the shape of rice koji. Some parts of the sample was easily broken despite the embedment, which lead us to use additional tool such as adhesive cryofilm or anti-roll plate in order to obtain a full section.

Discovering significant peaks is mostly the focus in data analysis. This study uses an approach of using MALDI-IMS to see potential quality-related compounds in koji, instead of previously screening the metabolites by using GC-MS or LC-MS. Koji was analyzed in a range of *m/z* 70 - 600 and the resulting mass spectra images were explored to find meaningful compounds. Region-of-interest (ROI) analysis was used as it provides a comparison between two areas and calculate the statistical significance. As the last step, metabolite identification was done by performing product ion scan of the characteristic peaks found from ROI analysis. Several interesting peaks from koji such as *m/z* 496.3 and *m/z* 104.1 were tentatively identified through this method as lysophophatidylcholine (LPC) 16:0 and choline, respectively. Lastly, the optimized method was used to compare and observe the differences in compound distribution between polished rice, steamed rice, and rice koji.

rice koji, imaging mass spectrometry, MALDI-IMS

講演番号：2B03a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B03 会場

ピペコリン酸とトリゴネリンが筋管細胞の糖取り込みならびにラットの耐糖能に及ぼす影響
Effect of pipecolic acid and trigonelline on glucose uptake in L6 myotubes and glucose tolerance in rats
○高橋 徹、沖浦 文（（公財）東洋食品研究所）
○Toru TAKAHASHI, Aya OKIURA (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】
イチジク果実に含まれるピペコリン酸（PIP）とトリゴネリン（TRG）の食品機能に関して、両物質を混合して与えると、ラット大腿筋由来 L6 筋管細胞の糖取り込みを促進することを見出している。この作用は糖尿病の予防・改善等に寄与する可能性がある。本発表では両物質について、筋管細胞の糖取り込みを促進する濃度条件、ならびに健常ラットの耐糖能に影響するかどうかを検討した結果を報告する。
【方法】
（1）筋管細胞への混合処理（n=6）：L6 細胞を筋管細胞に分化させた後、PIP は 2.5、10、40 μM、TRG は 0.25、1、4 μM の濃度で組み合わせて培地に添加し 24 時間培養した。培地交換後にインスリンを添加して刺激し、2-デオキシグルコース代謝速度測定キットで糖取り込み量を測定した。(2) 健常ラットへの混合投与 (n=4)：Wistar ラット（オス、6 週齢）を絶食させた後、PIP と TRG それぞれ 2.48 mg/kg と 0.26 mg/kg（低用量群）、または 24.8 mg/kg と 2.6 mg/kg（高用量群）を経口投与した（対照群には水を投与）。30 分後に 2 g/kg のブドウ糖を経口投与して糖負荷試験を開始した。試験終了後は心臓より採血し、生化学指標、インスリン値等を調べた。
【結果】
（1）筋管細胞の糖取り込み量は、PIP と TRG をそれぞれ 2.5 μM と 0.25 μM、10 μM と 1 μM、40 μM と 4 μM 処理すると有意に増加した。一方、PIP 2.5 μM と TRG 0.25 μM を処理しても、インスリン刺激を行わなかった場合は、取り込み量は増加しなかった。(2) 経口糖負荷試験中の血糖値は、両物質を投与した 2 群で対照群より低く推移する傾向を示したが、有意差はなかった。血漿の生化学指標にはほとんど影響はみられなかった。対照群のインスリン値は 1 個体でのみ 0.1 ng/mL、他 3 個体は検出限界以下（0.1 ng/mL 未満）であった。一方、低用量群では 2 個体で 0.7 ng/mL（他は不検出）、高用量群では 0.1～0.3 ng/mL であった。現在、血漿中の両物質濃度を測定中である。以上より、PIP と TRG は特定の濃度範囲および濃度比（PIP が TRG の 10 倍程度）で処理した場合に、筋管細胞の糖取り込みを促進すること、この作用にはインスリン刺激も必要なことが分かった。また、両物質は経口投与でも生体の糖代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

pipecolic acid, trigonelline, glucose uptake

講演番号：2B03a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B03 会場

植物性食品素材由来のα - グルコシダーゼ阻害物質の探索
α-Glucosidase inhibitors from food of plants
○濱田 麻衣佳、矢野 善久、深見 治一、藤田 裕之（京都学園大学）
○Maika HAMADA, Yoshihisa YANO, Harukazu FUKAMI, Hiroyuki FUZITA (Kyotogakuen Univ.)

目的）近年、食生活を取り巻く変容により、肥満をはじめとした生活習慣病の発症が増加している。中でも糖尿病は、様々な合併症を併発し、さらに心臓病や脳血管障害の要因ともなりうる疾病である。一方、α-グルコシダーゼは、小腸刷子粘膜上に存在する酵素であり、α-アミラーゼの作用により生じた二糖類を単糖類に分解し、小腸での糖の吸収に関わる酵素である。つまり、この酵素の働きを阻害すれば、単糖類への分解を遅延することで消化・吸収を緩やかにすることで、血糖値の上昇を抑制し、糖尿病を改善することが期待される。実際に、副作用として低血糖も生じさせないことから、医薬品も開発され、また食品素材からも種々の阻害物質に関する報告がされている。今回は、より強力な阻害食材を得る目的で、当研究室のある地元の食材を含め、各種植物性の素材についてスクリーニングを行うこととした。
方法）当研究室にてこれまでに作成してきた、亀岡産の食材の抽出サンプルライブラリーに加え、健康食品素材も含めた植物性食品素材を原料に使用した。これらの食材を熱水抽出（121℃、20 分）、70%エタノール抽出し、濾過後、濃縮、乾固し抽出サンプルを得た。α - グルコシダーゼ阻害活性の評価には、酵素にラットの小腸由来のα - グルコシダーゼを用い、基質にスクロース溶液を用いて検討した。この酵素反応により遊離したグルコース量をグルコース CⅡテストワコーを用いて測定し、減少した遊離グルコース量からサンプルの阻害活性を評価した。なお、スクリーニングには反応液最終濃度としてそれぞれ 1 mg/mL で評価した。
結果及び考察）抽出物 150 サンプルをスクリーニングした結果、8 サンプルが 50%以上の阻害活性を示した。これらの中には、抽出条件により大きく阻害活性が変わる物があり、抽出溶媒による影響を受けることが示唆された。活性が強かった抽出サンプルには、すでに報告のある桑の葉や、緑茶抽出物があったが、新たに苦丁茶（熱水抽出物：IC_{50}=0.577 mg/mL、エタノール抽出物：IC_{50}=0.352 mg/mL）や、ツバキ種子エキス（熱水抽出物：IC_{50}= 0.715 mg/mL、エタノール抽出物：IC_{50}= 0.812 mg/mL）を新たに見いだした。現在、これらの中で最も強力だった苦丁茶エタノール抽出物に含まれる阻害活性成分について単離・精製中であるが、苦丁茶には阻害活性を示すと考えられるカフェー酸やクマール酸も含まれているという報告もあり、現在これらも含めて検討中である。

α-Glucosidase inhibitor, anti-diabetes, food

講演番号：2B03a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B03 会場

2 型糖尿病モデルマウスにおける熟成ニンニク抽出液の高血糖に対する作用

The effect of aged garlic extract on hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes

○三木 里美、猪熊 健一、高嶋 美由希、牛島 光保、鈴木 順一朗、森原 直明（湧永製薬株式会社）
○Satomi MIKI, Ken-ichi INOKUMA, Miyuki TAKASHIMA, Mitsuyasu USHIJIMA, Jun-ichiro SUZUKI, Naoaki MORIHARA (Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】
熟成ニンニク抽出液 (Aged garlic extract：AGE)は、ストレス誘導性高血糖モデルおよびストレプトゾトシン誘導性1型糖尿病モデルの血糖値を改善することが報告されている。しかしながら、2型糖尿病におけるAGEの作用は明らかではない。2型糖尿病の発症要因の一つは、肥大化した脂肪組織における慢性炎症であり、この炎症の改善を図ることが重要であると考えられている。エネルギー代謝恒常性の維持に関わるAMP-activated protein kinase (AMPK)の活性亢進は、肝臓における糖新生の抑制や組織への糖取り込み量を増加させ、また、炎症に関わるToll-like receptor (TLR)シグナル伝達経路やインフラマソームを阻害し、糖尿病の症状を改善することが報告されている。近年、我々は細胞株においてAGEがAMPKの活性化を誘導することを見出した。そこで、自然発症2型糖尿病モデルマウスであるTsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD)マウスを用いて、AGEのAMPK活性化および糖尿病症状に対する作用について検討した。
【方法と結果】
TSODマウスに2%AGEを含有した通常飼料を19週間摂餌させ、血糖値と糖化アルブミン濃度の測定および糖負荷試験を行った。その結果、AGE投与群ではコントロール群と比較して、血糖値が低値を推移し、長期間の血糖値推移の指標である糖化アルブミン濃度を有意に抑制した。さらに糖負荷試験の結果から、耐糖能異常の改善が認められた。次に、脂肪、肝臓および筋肉組織におけるAMPKの活性化を評価した結果、AGE投与群ではAMPKのリン酸化が亢進していた。肥満による脂肪細胞の肥大化は、脂肪酸合成酵素(FAS)を活性化させることにより、遊離脂肪酸(FFA)の合成を促進する。さらに、FFAはTLRシグナル伝達経路を活性化することにより、単球走化性因子(MCP1)や腫瘍壊死因子(TNF-α)等の炎症因子の産生を誘導する。AMPKはFAS遺伝子の発現を抑制するため、脂肪組織における*Fas* mRNA発現量を測定したところ、AGE投与群では*Fas* mRNA発現量が有意に低下していた。さらに脂肪組織における炎症因子の発現量を測定した結果、AGE投与群では*Mcp1* mRNA発現量が有意に低下していた。
【結論】
AGE は、AMPK を活性化し、FFA の産生を低下させることにより炎症を抑制し、血糖改善作用を示す可能性が示唆された。

Hyperglycemia, Aged garlic extract, AMP-activated protein kinase

発表責任者：三木　里美（miki_s@wakunaga.co.jp）

講演番号：2B03a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B03 会場

宿儺かぼちゃ摂取はラット盲腸 *n*-酪酸を増加させ、盲腸と尿中のフェノールと *p*-クレゾールを低減化する

Ingestion of Sukuna-pumpkin increases *n*-butyric acid in cecum and reduces phenol and *p*-cresol in cecum and urine in rats

○中村 日南[1]、尾嶋 由梨[2]、袖垣 一也[3]、水野 文敬[3]、宮本 善秋[3]、石橋 裕也[3]、鈴木 徹[1,2]、中川 智行[1,2]、中村 浩平[1,2]、島田 昌也[1,2]、稲垣 瑞穂[1,2]、早川 享志[1,2] ([1]岐阜大学応用生物科学研究科、[2]岐阜大学応用生物科学部、[3]岐阜県中山間農業研究所)

○ Hina NAKAMURA[1], Yuri OJIMA[2], Kazuya SODEGAKI[3], Fumitaka MIZUNO[3], Yosiaki MIYAMOTO[3], Yuya ISHIBASI[3], Toru SUZUKI[1,2], Tomoyuki NAKAGAWA[1,2], Kouhei NAKAMURA[1,2], Masaya SHIMADA[1,2], Mizuho INAGAKI[1,2], Takashi HAYAKAWA[1,2] ([1]Graduate School of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [3]Gifu Prefectural Research Institute for Agricultural Technology in Hilly and Mountainous Areas)

宿儺かぼちゃは岐阜県飛騨地方で栽培されている伝統野菜である。かぼちゃは炭水化物や食物繊維含量の多い野菜であるとともに、レジスタントスターチ（RS）を豊富に含む食物でもある。RS の摂取効果の内、当研究室では大腸内環境改善効果について検討を行っている。予備的研究において、大腸内環境悪化因子であるチロシンを添加した飼料に宿儺かぼちゃ粉末を RS 相当 1%～4%レベル添加した飼料を与えた結果、RS 摂取レベルに応じた大腸内環境改善効果が観察された。そこで、最も改善効果が得られた 4%宿儺かぼちゃ粉末添加飼料と同等の RS を含む 10%ハイアミローススターチ（HAS）添加飼料について大腸内環境改善効果の比較検討を行った。

実験には Wistar 系雄ラット（6 週齢）を用いた。AIN-76 標準飼料で 5 日間予備飼育を行った後、AIN-76 標準飼料の Control（C）群、C＋5%チロシン添加飼料の T 群、T＋10%HAS 添加飼料の HT 群、T+21.2%宿儺かぼちゃ粉末添加飼料の ST 群の 4 群で 14 日間本飼育を行った。飼育 7 日目と 13 日目に 24 時間尿および糞を採取した。本飼育後の解剖より盲腸を採取、内容物重量、pH、短鎖脂肪酸(SCFA)、有害フェノール化合物の測定に用いた。本飼育中に採取した尿はクレアチニン、フェノール化合物の測定に用い、糞は糞中グルコースの測定および次世代シーケンサー（MiSeq）による 16S メタゲノム解析に供した。SCFA の測定は GLC により、フェノール化合物の測定は HPLC により行った。

盲腸内容物重量は T 群と比べ HT 群および ST 群で有意な増加が見られた。盲腸内容物 pH は T 群と比べ HT 群および ST 群で有意な低下が見られ、ST 群では HT 群よりもさらに有意な低下が見られた。盲腸における SCFA 量では、酢酸とプロピオン酸は T 群と比べ HT 群および ST 群で有意な増加、*n*-酪酸は T 群と比べ ST 群で有意な増加が見られた。盲腸におけるフェノール化合物量は、*p*-クレゾールにおいて T 群と比べて HT 群および ST 群で有意な減少が見られた。尿中フェノール化合物は、殆どが抱合体であり、フェノールおよび *p*-クレゾール量において、T 群と比べ HT 群と ST 群で有意な減少が見られた。糞中グルコース量は T 群と比べ ST 群で有意な増加が見られた。また、MiSeq による腸内細菌叢解析では、HT 群および ST 群で有用菌である *Bifidobacterium* 属菌の増加が確認できた。

以上の結果より、HAS と宿儺かぼちゃに含まれる RS 量は同等だが、宿儺かぼちゃ添加による効果は HAS 添加よりも高かった。宿儺かぼちゃ摂取による SCFA 量の増加や pH の低下は、腸内細菌による良い発酵基質として働くことで大腸内環境維持に、フェノール化合物量の有意な減少効果は大腸内環境悪化の防止が期待できることが明らかとなった。

resistant starch, phenolic compounds, *n*-butyric acid

講演番号：2B03a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B03 会場

プロシアニジンの高血糖抑制効果とその作用機構についての比較検討

Effect of procyanidin on anti-hyperglycemia through GLP-1 secretion and AMPK activation

○山下 陽子[1]、津田 孝範[2]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]中部大応用生物)
○Yoko YAMASHITA[1], Takanori TSUDA[2], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Chubu Univ.)

【目的】プロシアニジンは、カカオ豆、黒大豆種皮、ブドウ種子などを代表とする食品に多く含まれるポリフェノールの一種で、エピカテキンが重合した構造を持つ難吸収性のポリフェノールである。すでに、エピカテキンをはじめとする単量体のカテキン類が高血糖や肥満を抑制する報告はあるが、プロシアニジンは重合度が高くなると体内へ吸収されないことから生体利用性が低く、機能性が十分に解明されていない。そこで、プロシアニジン化合物を用いて、高血糖に対する予防効果とその作用機構について比較検証した。

【方法】ラット骨格筋由来 L6 細胞に、単量体のエピカテキンとプロシアニジン２から４量体を作用させた後、グルコースアナログである２-デオキシグルコースを添加した際、細胞内への糖取込みに及ぼす効果を検証した。この際、糖輸送担体(GLUT4)の細胞膜移行とそのシグナル伝達経路への影響も検証した。また、実験動物を用いて、エピカテキンとプロシアニジン４量体までの化合物を強制経口投与にて単回投与した際の血糖調節効果を検証し、筋肉における GLUT4 の細胞膜移行量とそれに関わるシグナル伝達経路も検討した。さらに、動物実験においては、化合物を投与した６０分後の血中インクレチンホルモン、アディポネクチン、インスリン量も測定した。

【結果】L6 細胞にエピカテキンとプロシアニジンを作用させた際、細胞内への糖取込み促進効果が認められ、その効果は４量体までは重合度依存的であった。この時、筋肉において GLUT4 の細胞膜移行が促進していることが明らかとなった。そのシグナル経路には、インスリン経路は関わらず、インスリン非依存的な AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）経路が関与していることが判った。次に、動物実験でエピカテキンあるいはプロシアニジン２から４量体を化合物レベルで強制経口投与した６０分後に糖負荷試験を実施したところ、４量体までは重合度依存的にプロシアニジンが糖負荷後の血糖上昇を有意に抑制した。この時、筋肉における GLUT4 の細胞膜移行が促進していることが確認され、その作用機構は細胞実験で認められた経路と同じ AMPK の活性化が関わっていた。さらに興味深いことに、動物実験を行った時のみ、インスリン経路も活性化していることが明らかとなった。これには、消化管ホルモンであるインクレチンホルモンの分泌促進によるインスリン分泌が関与していることが明らかとなった。特にその効果は４量体で高いことが判った。以上の結果より、プロシアニジンは、腸管でのインクレチン効果と AMPK 活性化効果の両方の作用を発揮することで、筋肉における GLUT4 の細胞膜移行を介して、血糖調節に寄与すると考えた。

prucyanidin, GLP-1, anti-hyperglycemia

発表責任者：山下　陽子（yoko.y@crystal.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2B03a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B03 会場

麹菌を用いた発酵によるリンゴ未熟果のデンプン分解酵素阻害活性の向上

Fermentation of unripe apple using koji mold increases inhibitory activity of starch-degrading enzymes

○井澤 弘美、小川 千紗、鈴木 菜、舘花 春佳、乗鞍 敏夫、今 淳（青森県立保健大）
○Hiromi IZAWA, Chisa OGAWA, Sai SUZUKI, Haruka TATEHANA, Toshio NORIKURA, Atsushi KON (Aomori Univ. of Health and Welfare)

【緒言】

リンゴ未熟果には成熟果に比べ大量のポリフェノール類が含まれている。ポリフェノール類は、α-アミラーゼやα-グルコシダーゼなどのデンプン加水分解酵素を阻害することが知られている。また柿未熟果の麹菌を用いた発酵によって、β-リパーゼ阻害活性の増強が報告されている。そこで、リンゴ未熟果の麹菌を用いた培養を行い、ヒト唾液由来α-アミラーゼ、ブタ膵臓由来α-アミラーゼ、パンクレアチン及びα-グルコシダーゼに対する阻害活性を検討した。

【研究方法】

リンゴ未熟果を搾汁し、残渣を 60℃で乾燥させ、粉砕したものを試料とした。種菌は *Aspergillus oryzae* AOK139 株を(株)秋田今野商店から購入して使用した。リンゴ未熟果試料に無機塩類及び蒸留水を加えて滅菌し、液体培地とした。麹菌を培地に接種し、30℃で液体振盪培養を行った。培養物を遠心分離し、その上清をリンゴ培養上清とした。沈殿物は乾燥させ、リンゴ培養沈殿物とした。リンゴ未熟果試料及びリンゴ培養沈殿物は 50%エタノール溶液で加熱抽出後に遠心分離し、その上清を減圧濃縮後に加水して、測定試料とした。培養上清は、そのまま測定試料とした。ヒト唾液由来α-アミラーゼ、ブタ膵臓由来α-アミラーゼ、パンクレアチン及びα-グルコシダーゼの阻害活性は常法にて測定した。

【結果および考察】

リンゴ未熟果は、実験で使用した全ての酵素に対して阻害活性を示した。培養上清は、実験で使用した全ての酵素に対して経時的に阻害活性が増加した。このことから、培養を行うにつれて阻害物質の生成量が増加することが考えられた。培養沈殿物では、ヒト唾液由来α-アミラーゼ、ブタ膵臓由来α-アミラーゼ、パンクレアチンにおいて 24 時間と 72 時間で阻害活性が増加した。このことから、24 時間と 72 時間の時にそれぞれ阻害物質が生成されていることが考えられた。また培養沈殿物のα-グルコシダーゼ阻害活性では、他の酵素と異なり 72 時間では阻害活性の増加が見られなかった。

【結論】

リンゴ未熟果には、本研究で用いた酵素の阻害活性を有することが確認された。加えて、リンゴ未熟果の麹菌発酵物では、これらの酵素の阻害活性が増加されることが示された。

apple, koji mold, starch-degrading enzyme

発表責任者：井澤弘美（h_izawa@auhw.ac.jp）

講演番号：2B04a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B04 会場

外因性酸化コレステロールの体内動態及び蓄積性の検討
Elucidation of pharmacokinetics and accumulation of exogenous oxidized cholesterols in rats
○中堀 紘花、加藤 慧士、長田 恭一 (明治大農)
○Hiroka NAKAHORI, Satoshi KATOU, Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

【目的】
コレステロールが酸化されて生成する酸化コレステロール(Oxc)は、動脈硬化、認知症、骨粗鬆症等の様々な疾病に関与している可能性が示唆されている。生体内の Oxc は、酵素的及び非酵素的に生成する内因性のものと、動物性加工食品の摂取による外因性のものがある。近年、加工食品を利用した食事摂取の機会が増大しているため、外因性 Oxc の摂取量増加が懸念されている。しかし、摂取した外因性 Oxc の体内動態とその蓄積性については明らかになっていない。特に脳においては、血液脳関門を通過する Oxc の分子種として内因性の 24S-hydroxycholesterol が知られているが、外因性の Oxc が脳組織まで到達するのかどうかは明らかになっていない。本研究ではラットに Oxc を経口投与し、7 日間の経日的な Oxc の体内動態及び各組織への蓄積性について検討した。
【方法】
6 週齢 Wistar 系雄性ラットを 12 時間絶食させた後、Oxc を 50 mg 含むエマルションを胃内に強制投与した。0、1、2、3、7 日後に解剖を行い、血漿、肝臓、腎臓、心臓、大腸、糞及び脳を採取した。血漿は超遠心分離により、VLDL、LDL 及び HDL 画分に分画した。各臓器とリポタンパク質画分の Oxc レベルは脂質抽出後、GC-MS を用いて測定した。
【結果・考察】
血漿、VLDL、LDL では、経日的に Oxc が増大した。一方、肝臓および HDL では、投与前と比較して Oxc 投与後 1 日目で Oxc レベルが最大値となり、その後経日的に減少したものの、HDL の Oxc レベルは 7 日目でもウォッシュアウトされなかった。心臓では、各 Oxc 分子種が投与後 1 日目で増大し、投与後 2 日目にはほぼウォッシュアウトされた。腎臓では 7β-hydroxycholesterol、6-ketocholestanol、7-ketocholesterol が投与後 1 日目で増大しその後経日的に減少した。大腸内容物では、5-epoxycholesterols が経日的に増大し続け、その他の Oxc 分子種は投与後 1 日目では増大したが、その後は減少に転じた。以上のことから、食事から摂取した Oxc は小腸で吸収された後にリポタンパク質を介して全身へ運ばれ、種々の分子種の中でも 7β-hydroxycholesterol、cholestantriol、6-ketocholestanol、7-ketocholesterol は各臓器から排出されやすい可能性が明らかとなった。現在、脳内の Oxc 動態については検討中である。

oxidized cholesterol, pharmacokinetics, rat

講演番号：2B04a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B04 会場

ヒト酸化 LDL 受容体のグルカン結合活性
Glucan-binding activity of human LOX-1
○武藤 愛里[1]、原田 悠宇[2]、福村 藍[1]、安藤 郷[1]、堀 公法[2]、岡村 璃沙[2]、木落 信郎[1]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2] ([1]名城大院農、[2]名城大農)
○ Airi MUTO[1], Yutaka HARADA[2], Ai FUKUMURA[1], Go ANDO[1], Kiminori HORI[2], Risa OKAMURA[2], Noburo KIOCHI[1], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Agric., Meijo Univ.)

日本人の死因の第 1 位は悪性新生物であり、心疾患、肺炎、脳血管疾患がそれに続く。心疾患と脳血管疾患の原因はアテローム性動脈硬化症であることが多く、両疾患を合わせると悪性新生物に匹敵する割合となる。アテローム性動脈硬化症は、低密度リポタンパク質（LDL）が酸化されて生じる酸化 LDL を、免疫細胞や血管内皮細胞の表面に発現している酸化 LDL 受容体（LOX-1）が認識し、内部に取り込むことで起こる。その結果、動脈内壁には粥状（アテローム性）の隆起（プラーク）が形成され、プラークが大きくなると血流の減少や遮断によって虚血が引き起こされる。プラークが破裂すると血栓が形成され、動脈が閉塞して心疾患や脳血管疾患となる。このアテローム性動脈硬化症の発症メカニズムを理解し、応用することにより血管疾患の予防法や治療法が開発できると考えられており、その有望な標的分子がヒト LOX-1（hLOX-1）である。hLOX-1 は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、首ドメイン、C 型レクチン様ドメイン（CTLD）から構成されるⅡ型の膜タンパク質であり、CTLD で酸化 LDL に結合することが知られている。しかしながら、ヒト酸化 LDL におけるリガンドの構造や CTLD のレクチン活性については不明な点が多い。また、hLOX-1 は β-グルカン受容体であるヒト Dectin-1 と相同性があることから、hLOX-1 の CTLD も β-グルカン結合活性を有する可能性がある。そこで、hLOX-1 の組換えタンパク質を作製し、レクチン活性の有無を調べることを目的として研究を行った。

hLOX-1 の首ドメインと CTLD から成る細胞外領域（ECD）あるいは CTLD の N 末端側に His タグを融合させた組換えタンパク質をカイコ-バキュロウイルス発現系で発現させ、アフィニティー精製を行った（His-hLOX-1/ECD あるいは His-hLOX-1/CTLD）。組換え hLOX-1 を不溶性糖鎖ゲルと混合し、インキュベーションおよび遠心分離を行った後、非結合画分として上清を回収した。続いて洗浄および溶出を行い、洗浄画分および結合画分とした。各画分の SDS-PAGE/ウェスタンブロット解析を行い、結合活性を評価した。その結果、His-hLOX-1/ECD だけが二量体を形成し、特定の β-グルカンと結合することが明らかになった。また、GFP と hLOX-1/ECD を融合させた組換えタンパク質を用いて、β-グルカン結合におけるカルシウム依存性を調べたところ、hLOX-1 の β-グルカン結合活性にカルシウムは必須ではないものの結合を強化することが明らかとなった。

これらの結果から、hLOX-1 は β-グルカン結合能を有し、機能性食品成分としての β-グルカンが動脈硬化を予防するとされていることと関連がある可能性が示唆された。

human LOX-1, ß-glucan, baculovirus-silkworm expression system

発表責任者：武藤愛里（air610meijo@gmail.com）

講演番号：2B04a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B04 会場

組換えヒト酸化 LDL 受容体の糖結合特異性
Carbohydrate binding specificity of recombinant human LOX-1
○原田 悠宇[1]、武藤 愛里[2]、福村 藍[2]、安藤 郷[2]、堀 公法[1]、岡村 璃沙[1]、木落 信郎[2]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2] ([1]名城大農、[2]名城大院農)
○ Yutaka HARADA[1], Airi MUTO[2], Ai FUKUMURA[2], Go ANDO[2], Kiminori HORI[1], Risa OKAMURA[1], Noburo KIOCHI[2], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Fac. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

LOX-1 は血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなどの表面に存在するスカベンジャー受容体の一種である。LOX-1 は細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、首ドメイン、C 型レクチン様ドメイン（CTLD）からなるⅡ型膜タンパク質であり、酸化低密度リポタンパク質（酸化 LDL）に対する主な受容体である。ヒト LOX-1（hLOX-1）が血中の酸化 LDL を認識して動脈壁内部に取り込むことによりアテローム性動脈硬化症が引き起こされるため、本受容体は動脈硬化の発症メカニズムの解明にとって最も重要な分子の１つであり、その予防法や治療法の開発のための標的分子でもある。アテローム性動脈硬化症患者の動脈壁の肥厚部分（アテローム性プラーク）には酸化 LDL が多量に蓄積され、動脈壁が厚くなることや、柔軟性が失われることによって心筋梗塞や脳卒中などの重大な疾患が引き起こされることが知られている。アテローム性動脈硬化症は最も一般的な動脈硬化症であり、動脈硬化症に起因する心筋梗塞と脳卒中を合わせると日本人の死因の第２位となる。食品中のβ-グルカンに動脈硬化に対する予防効果があるとされていることも合わせて、アテローム性動脈硬化症の発症メカニズムの解明は興味の持たれるところであるが、hLOX-1 のリガンド認識機構には不明な点が多い。また、hLOX-1 はβ−グルカン受容体であるヒト Dectin-1 とアミノ酸配列類似性を有している。そこで本研究では hLOX-1 の糖結合特異性、特にβ−グルカン結合特異性について組換えタンパク質を用いて定量的に解析することを目的とした。

hLOX-1 の首ドメインと CTLD から成る細胞外領域（ECD）の N 末端側に FLAG タグ、His タグ、GFP を融合させた組換えタンパク質をカイコ−バキュロウイルス発現系で発現させ、アフィニティー精製を行った。本組換えタンパク質が二量体を形成していることが SDS-PAGE/ウェスタンブロット解析によって確認された。この組換え hLOX-1 を様々な不溶性糖鎖ゲルと混合し、インキュベーションおよび遠心分離を行った後、非結合画分として上清を回収し、蛍光を測定して糖結合特異性を定量的に解析した。その結果、本組換え hLOX-1 は特定のβ−グルカンと特異的に結合することが明らかになった。

これらの結果から、GFP を融合させた本組換え hLOX-1 は活性を有する可溶性タンパク質として精製され、hLOX-1 の内因性および外因性のリガンドを探索するためのプローブとして使用可能であることが示唆された。

human LOX-1, ß-glucan, GFP

発表責任者：原田悠宇（a1do2re3su@yahoo.co.jp）

講演番号：2B04a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B04 会場

機能性リン脂質がリポ蛋白質代謝関連遺伝子に及ぼす影響

Effects of functional phospholipids on expression of genes involved in lipoprotein metabolism

○藤盛 和子[1]、山﨑 裕也[2]、杉山 梢[2]、滋野 浩一[2]、前場 良太[3]、原 博[4]、西向 めぐみ[1]([1]岩手大農、[2](株)ADEKA、[3]帝京大医、[4]北大院農)
○Wako Fujimori[1], Yuya Yamazaki[2], Kozue Sugiyama[2], Koichi Shigeno[2], Ryouta Maeba[3], Hiroshi Hara[4], Megumi Nishimukai[1] ([1]Iwate Univ., [2]ADEKA Co., [3]Teikyo Univ., [4]Hokkaido Univ.)

目的：プラスマローゲン(Pls)は人体内のリン脂質の約 18%を占めるグリセロリン脂質であり、酸化ストレスに対する防御的な働きが認められている。低比重リポ蛋白質（LDL）は体内において活性酸素などの作用により酸化することで酸化 LDL となり、アテローム形成を惹起する。これまでの実験で動脈硬化症及びその疑いのある患者において健常者に比べ血漿 Pls 濃度の低下が報告されている。更に、患者群内で冠動脈に有意狭窄を認めた患者では認めない患者よりも血漿コリン型 Pls（PlsCho）濃度が有意に低下することが報告されている。本実験では、動脈硬化症と Pls の関連性の解明を目的とし、PlsCho と Pls の前駆体であるアルキル型リン脂質(Alk)を、リポタンパク質代謝に関係する部位のモデル細胞である、ヒト急性単球性白血病由来細胞株 THP-1（マクロファージ)、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2（肝臓）およびヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2（小腸）の 3 種類の細胞に添加し、脂質輸送タンパク質の遺伝子発現の発現を検討した。
方法：HepG2 はコンフルエント後に４日間の脂質添加実験を、THP-1 と Caco-2 は分化後に、THP-1 は４日間、Caco-2 は４時間の脂質添加実験を行った。THP-1、HepG2 には、培地中最終濃度 0.0625mM～0.25mM の範囲で、Caco-2 には 0.02mM～2mM の範囲で PlsCho または AlkCho を添加した。さらに比較対照としてジアシル型コリンリン脂質（DiCho）添加群を設けた。各細胞は脂質添加後、mRNA 抽出を行い、脂質輸送タンパク質の遺伝子発現について RT-PCR による解析を行った。
結果・考察：①APOB-100 の遺伝子発現は、HepG2 において、各リン脂質の添加で低下し、特に PlsCho で濃度依存的な低下が見られた。②ABCA1 の遺伝子発現は、THP-1 において各種リン脂質の添加で上昇したが、PlsCho および DiCho 添加群で AlkCho 添加よりも高くなった。HepG2 では THP-1 のような変化は見られなかった。Caco-2 では、2mMPlsCho 添加群と DiCho 添加群で、コントロール群と比較して発現が上昇した。③APOA1 の遺伝子発現は、HepG2 において PlsCho 添加群と DiCho 添加群で濃度依存的に低下した。
これらの結果は、リン脂質の種類によって、脂質輸送タンパク質に対する影響が異なること、また、同じ遺伝子でも臓器によって異なることを示している。

plasmalogen, alkylphospholipid, lipoprotein metabolism

講演番号：2B04a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B04 会場

ホスファチジルコリン摂取後のリンパ液中サイトカイン濃度
Effects of dietary phosphatidylcholine on postprandial lymphatic cytokine levels in rats
○武山 藍、城内 文吾、河内 明日香、有馬 優子、佐藤 匡央（九大院・農）
○AI TAKEYAMA, BUNGO SHIROUCHI, ASUKA KAWAUCHI, YUKO ARIMA, MASAO SATO (Kyushu Univ.)

【目的】食事脂質の吸収変動はリンパ系が発達した臓器である腸管の炎症反応に対して影響を与え、ひいては末梢組織での炎症惹起に関与すると考えられている。リン脂質の摂取によるリンパ輸送量の制御が報告されている。その際の炎症に対する影響に関する報告は見当たらない。本研究では、卵黄と大豆由来のホスファチジルコリン（PC）を摂食させたラットからリンパ液を採取し、食餌 PC がリンパ液中炎症性サイトカイン濃度に与える影響を調べた。

【方法】8 週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラットに半永久胸管リンパカニュレーション手術を施した。術後 3 日目に、AIN-76 組成に準じた TAG 食（Lard 10%）、卵黄 PC（EPC）食（Lard 7% + EPC 3%）および大豆 PC（SPC）食（Lard 7% + SPC 3%）を与え、7 時間経時的にリンパ液を採取した。リンパ液中の脂質濃度は酵素法により、27 種類のサイトカイン濃度は磁気ビーズ抗体を用いたマルチプレックスアッセイにより測定した。リンパ液中のカイロミクロン粒子径はレーザー回折式粒度分布測定装置により測定した。また腸管健全性評価として、リンパ液中のジアミンオキシダーゼ（DAO）活性を測定した。

【結果】摂食量、リンパ流量に差は認められなかった。TAG 群と比較して、リン脂質輸送量は EPC および SPC 群で増加傾向を示し、コレステロール輸送量は EPC 群で有意に増加した。リンパ液中のカイロミクロン粒子径は PC 摂取により有意に小さくなった。また PC 摂取は TAG 群と比較して、リンパ液中炎症性サイトカイン濃度（RANTES, IFN-γ, IP-10）を有意に低下させ、この低下量は EPC 群よりも SPC 群で大きかった。リンパ液中の DAO 活性は TAG 群と比較して、EPC 群および SPC 群で有意に高値であった。以上より、PC 摂取は脂質のリンパ輸送を促進する一方、食後のリンパ液中炎症性サイトカイン濃度を低下させることが示された。これらの作用にはリンパ液中カイロミクロンの比表面積の大きさおよび腸管の健全性維持が関与していることが示唆された。

Phosphatidylcholine, Lymphatic cytokines, Thoracic lymph duct cannulation

講演番号：2B04a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B04 会場

テアフラビンの胆汁酸トランスポーター阻害機構の解明
Elucidation of the inhibitory mechanism by theaflavin on bile acid transporter
○宮脇 里奈[1]、石川 和樹[2]、石井 剛志[3]、小川 真奈[2]、小林 彰子[2] ([1]東大農、[2]東大院農、[3]神戸学院栄)
○Rina MIYAWAKI[1], Kazuki ISHIKAWA[2], Takeshi ISHII[3], Mana OGAWA[2], Shoko KOBAYASHI[2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tokyo, [3]Kobegakuin Univ.)

【目的】
食後胆管を通じて腸管に排出される胆汁酸の 95%は、小腸下部に発現する胆汁酸トランスポーター(apical sodium-dependent bile acid transporter , ASBT)から再吸収され、肝臓へと運ばれ、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。肝臓で生合成される胆汁酸はコレステロールを原料とするため、腸管からの胆汁酸の再吸収抑制はコレステロールからの胆汁酸への変換を促進し、血中コレステロールの低下をもたらす。現在、胆汁酸を吸着し血中コレステロールを低下させる薬剤としてコレスチラミンがあるが、ASBT を直接阻害し、血中コレステロールを低下させる成分はほとんど報告されていない。我々は ASBT を阻害する食品成分として紅茶に含まれる苦味色素成分である theaflavin-3-gallate (TF2A)および theaflavin-3'-gallate (TF2B)を同定している。本研究では発現細胞を用いた系でこれらテアフラビン類の阻害機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】
我々は昨年度の本大会で、TF2A がタウロコール酸結合に必要な ASBT の Cys に結合し、タウロコール酸の輸送を阻害する可能性を報告した。そこで、タウロコール酸結合の可能性のある Cys 9 個をそれぞれ Ala に置換した ASBT 変異コンストラクトを作製した。ヒト延長因子 1α（*hEF1α*）プロモーター下に *hASBT* の塩基配列をつなぎ、ASBT 強制発現コンストラクト pEF-ASBT を作製した。Lipofectamine 3000 トランスフェクションキットを用いて、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞にコンストラクトを導入した。TF2A および 2B でプレインキュベートした後、[^{3}H]タウロコール酸を添加し、一定時間後 HeLa 細胞に取り込まれたタウロコール酸量を液体シンチレーションカウンターで測定した。
【結果・考察】
TF2A および 2B は、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞において、ウオッシュアウト後においてもタウロコール酸の吸収を阻害した。野生型 ASBT を発現させた HeLa 細胞では、Mock 細胞と比較して、タウロコール酸の取り込み量が 10～20 倍上昇し、TF2A および 2B により取り込みが阻害された。9 種の ASBT 変異体のタウロコール酸取り込みを調べたところ、Ala に変異させるとタウロコール酸の取り込みに影響を及ぼす Cys 残基が複数存在した。現在は作製した ASBT 変異体発現細胞を用いて、TF2A および 2B の阻害部位を検討している。本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

theaflavin, transporter, bile acid

講演番号：2B04a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B04 会場

マヌカ蜂蜜に含まれるレプトスペリン及びメチルシリンゲートの培養細胞を用いた代謝研究

Study on metabolism of leptosperin and methyl syringate found in manuka honey using culture cells

○加藤 陽二[1,2]、室田 佳恵子[3]、石坂 朱里[1,2]、伊藤 美紀子[1,2]、生城 真一[4] ([1]兵庫県大環境人間、[2]兵庫県大先端食セ、[3]近大理工、[4]富山県大工)
○Yoji Kato[1,2], Kaeko Murota[3], Akari Ishisaka[1,2], Mikiko Ito[1,2], Shinichi Ikushiro[4] ([1]Univ. Hyogo, [2]RIFNS, [3]Kindai Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

マヌカ（Leptospermum scoparium）の花蜜から得られるマヌカ蜂蜜には、新規配糖体 Leptosperin 及びそのアグリコンである Methyl syringate (MSYR)が、およそ 100 mg/kg 以上と豊富に含まれている。また Leptosperin は Leptospermum 属に特異的な成分と考えられており、マヌカ蜂蜜の純度を見極めるための品質保証（認証）マーカーとしての応用が進められている。これまで、Leptosperin 及び MSYR の代謝研究を進め、動物及びヒトの血中及び尿中から主要な代謝物として MSYR の硫酸抱合体（MSYR-S）やグルクロン酸抱合体（MSYR-GA）を同定・定量している。また、体内からアグリコンである MSYR 及びそのメチルエステルが外れた Syringic acid (SYR)も検出されており、尿中から Leptosperin もわずかながら検出される。これら成分の代謝については腸内細菌叢の影響も受けると考えているが、詳細な代謝機序は不明である。本研究では、ヒト由来肝細胞モデルとして HepG2 及び腸上皮細胞モデルとして Caco-2 を用い、Leptosperin、MSYR、及びその代謝物（MSYR-S, MSYR-GA, SYR）の in vitro における代謝を解析した。また、Leptosperin、MSYR-S、MSYR-GA については、特異的な蛍光特性を有する点に着目し、高感度検出が可能な HPLC-蛍光検出を構築し、HPLC-UV と合わせて検出定量に用いた。

【方法】MSYR 及び SYR は市販品を使用した。Leptosperin は有機合成し、MSYR-S 及び MSYR-GA の標品は抱合酵素発現酵母により合成したものを精製して用いた。継代した細胞を 2.5%の血清入り培地で一晩培養後、無血清培地に交換し、100 μM の各種成分を添加し、最大 24 時間、CO2 インキュベーターで培養した。経時的に培養上清をサンプリングし、HPLC-UV 及び蛍光検出により成分を定量した。

【結果・考察】MSYR は経時的に減少し、それに伴い SYR、MSYR-S、MSYR-GA が生じた。MSYR の減少は、ほぼこの 3 成分への転換で説明できた。Caco-2 細胞の場合は、HepG2 細胞と比較して SYR への転換率が高く、エステラーゼの活性が高いことが考えられた。一方、Leptosperin、SYR、MSYR-S、MSYR-GA を細胞と共存させた場合は、変化が認められなかった。マヌカ蜂蜜摂取に伴い、血液・尿中から SYR の硫酸抱合体（SYR-S）やグルクロン酸抱合体（SYR-GA）も見出されるが、今回、いずれの培養細胞系からも SYR の代謝物は検出されなかった。以上の事から、Leptosperin は腸内細菌により糖部分が外されて MSYR となり代謝されることが予想された。5 成分のなかで MSYR のみが細胞により代謝され（SYR に変換か、あるいは抱合化）、また SYR が抱合化されにくいことは、興味深い知見であり、更なる解析を進めている。

manuka honey, leptosperin, methyl syringate

発表責任者：加藤　陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：2B04a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B04 会場

Calluna vulgaris からのα-グルコシダーゼ発現量抑制物質の探索

Elucidation of substances that suppress expression of intestinal α-glucosidase from *Calluna vulgaris*

○野田 耕太、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Kota NODA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

【背景・目的】2017 年において、世界の成人の 11 人に 1 人が糖尿病患者と推計されている。糖尿病は心疾患や脳卒中など心血管疾患のリスクを増大させるため、その予防や治療法の改善と開発が急務とされている。消化管α-グルコシダーゼは糖質の消化吸収過程において、二糖から単糖への分解を行う小腸上皮粘膜上の酵素である。この酵素の阻害剤は単糖の体内への吸収を緩やかにし、食後の急激な血糖値上昇を抑えることができるため、糖尿病の予防や治療に利用されている。一方で、α-グルコシダーゼの発現量を減少させた場合にも、同様の効果が期待できると考えられる。そこで本研究では消化管α-グルコシダーゼの量に着目し、その発現を抑制する天然素材を探索することを目的とした。
【方法】消化管α-グルコシダーゼ量の測定モデルとして Caco-2 細胞を用いた。分化させた細胞に被験物質を添加して 2 日間培養後、蛍光基質を用いたα-グルコシダーゼ反応速度の測定によって酵素活性を求め、α-グルコシダーゼ量の減少の指標とした。
【結果】この簡易評価法を用いて候補素材として見出したヘザーフラワー (*Calluna vulgaris*) [1]からのα-グルコシダーゼ発現量抑制物質の探索を行った。ヘザーフラワーの 50%メタノール水溶液抽出物 (CV-E) を Diaion HP-20、Cosmosil 75C18-OPN、Sephadex LH-20 を用いたクロマトグラフィーによって順次分画を進め、HPLC により精製して、活性成分を得た。各種分析の結果、活性成分はカテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、A 型のプロアントシアニジン二量体を構成単位とする平均重合度 11.8 のプロアントシアニジン (CV-P) であることが分かった (Figure 1) 。CV-P は Caco-2 細胞に対して 0.125 mg/mL で約 30%のα-グルコシダーゼ量の低下活性を示し、また、α-グルコシダーゼ群のうちスクラーゼ－イソマルターゼ複合体の mRNA 発現量を有意に低下させた。

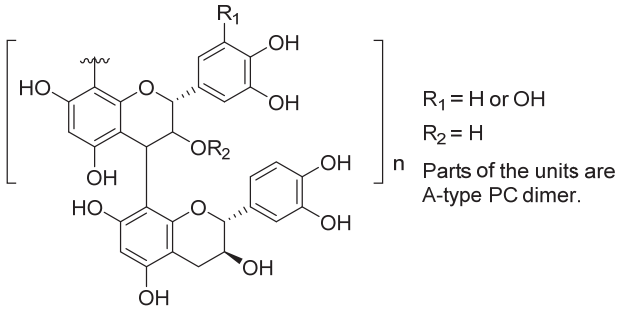


Figure 1. The structure of CV-P

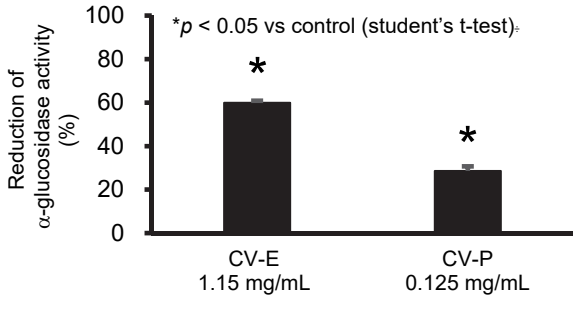


Figure 2. Reduction of α-glucosidase activity

1）野田ら 2017 年度本大会（講演番号 2C13p01）

α-glucosidase, Caco-2 cells, Proanthocyanidin

講演番号：2B04a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B04 会場

かつお節由来 DPPIV 阻害ペプチドの単離・同定及び機能性・吸収性評価

Identification of katsuobushi-derived DPPIV inhibitory peptides and its evaluation of DPPIV inhibition and absorption

○山本 晃久[1]、関 英治[3]、藤原 佳史[3]、薩 秀夫[2] ([1]前工大院・工、[2]前工大・工、[3]ヤマキ(株))
○Akihisa Yamamoto[1], Eiji Seki[3], Yoshihumi Fujiwara[3], Hideo Satsu[2] ([1]Dept. of biotech., Maebashi institute of technology, [2]Maebashi institute of technology, [3]Yamaki Co., Ltd.)

【目的】近年糖尿病患者は増加の一途を辿り、今後さらなる増加が懸念されている。血糖値の低下にはインスリンが必要であるが、インスリン分泌はインクレチンの一種である GLP-1 によって促進される。しかしながら GLP-1 はペプチダーゼの一種であるジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) によって急速に分解されることが知られている。従って DPPIV 阻害剤は糖尿病の治療薬として幅広く用いられており、また食品の中にも DPPIV 阻害活性を有する成分が報告されている。当研究グループでは、かつお節熱水抽出残渣の酵素分解物に含まれるペプチドに DPPIV 阻害活性を有するペプチド画分を得た。そこで本研究では、ペプチド画分に含まれる DPPIV 阻害ペプチドを同定するとともに、実際にペプチド画分が血糖値上昇を抑制する効果がみられるかどうか実験動物を用いて検討した。さらに腸管上皮透過モデルを用いて、DPPIV 阻害ペプチドの腸管上皮透過機構についても検討を進めた。
【方法及び結果】かつお節熱水抽出残渣を20種類の酵素処理後、DPPIV阻害活性の高い酵素分解物(スミチームLP50D: *Aspergillus oryzae*由来, DPPIV阻害活性IC50;376.13μg/ml)を得た。さらに、Sep-Pac C18カラムを用いた酵素分解物のエタノール濃度のステップワイズグラジエントにより10%エタノール溶出高阻害活性画分(鰹節ペプチド:DPPIV阻害活性IC50;102.93 μg/ml)を得た。鰹節ペプチドはUPLC (Waters製 Acquity UPLC BEH C18 (2.1mmID×150mmL, 1.7μm), 15%アセトニトリル in 0.1%TFA)に負荷、リクロマトグラフィー後、ピークをN末端アミノ酸配列解析(島津PPSQ-33A)に供し、26種類のペプチド(WL,MW,LPL,WV,FL,MPF,MPL,LW,WI,WGDAGAM,AW,AGAMP,EVF,FP,WY,SW,WM,IF,GW,VW,VF,LF, IW,GVF, GL及びAVF) を同定した。これらのペプチドのDPPIV阻害活性と画分中の含量を数値化したところ、Trp-Val(WV)が主要なDPPIV阻害成分であることが示唆された。次に、ペプチド画分をグルコース投与10分前にICRマウスに投与した後、経口グルコース負荷試験をおこなった。グルコース負荷開始後0, 30, 60, 90, 120分後に血液を回収し血糖値を計測した結果、ペプチド投与群ではコントロール群と比較して、血糖値の上昇が有意に抑制されることが示された。さらに、WVの腸管上皮透過を解析するため、Caco-2細胞を透過性膜上に2週間培養して腸管上皮様に分化させin vitro腸管上皮モデルを構築した。分化させたCaco-2細胞の管腔側にWVを添加して37℃でインキュベートし、一定時間後、基底膜側の透過液、管腔側の残存液、細胞の可溶化液を回収し、UPLCにより定量した。その結果WVは濃度依存的・時間依存的にCaco-2細胞層を透過することが示された。現在さらに、WVのCaco-2細胞層透過特性について検討を進めている。

DPPIV, bioactive peptide, Caco-2

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2B04a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B04 会場

尿酸トランスポーターを制御する食品成分探索評価系の構築
Development of evaluation system to search for food components which regulate uric acid transporter
○近藤 泰嗣、諏訪 竣亮、薩 秀夫（前工大・工）
○Taishi KONDO, Shunsuke SUWA, Hideo SATSU (Maebashi Institute of Technology)

【目的】尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物であるが、今日の食生活では尿酸値の増加が懸念されている。血清尿酸値が高くなると痛風や尿路結石を発症しやすくなることに加え、近年動脈硬化症・心血管疾患・腎疾患・高血圧・アルツハイマー病などの病態発症との関連性が報告されている。尿酸の体内動態に関しては長らく不明であったが、近年のゲノムワイド関連解析の進展により、幾つかのトランスポーターの関与が明らかとなってきた。グルコーストランスポーターの一つである GLUT9 はグルコースよりも尿酸を基質として輸送する尿酸トランスポーターであり、尿酸の輸送に重要な働きを担っている。GLUT9 にはバリアント 1 (Short)とバリアント 2 (Long)の二つのバリアントが存在し、Short は腎上皮細胞の管腔側に Long は基底膜側に発現している。特に GLUT9L は腎臓での再吸収に大きく関与しているが、GLUT9L 活性を阻害する食品成分に関する報告についてはなされていないのが現状である。そこで本研究では、GLUT9L 活性を安定に評価できる GLUT9L 高発現細胞株の樹立および GLUT9L 活性を阻害する食品因子の探索を目的とした。
【方法】ヒト GLUT9L 発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 にリポフェクション法にてトランスフェクションした後、抗生物質を添加して培養を続けた。薬剤選抜後、さらに限界希釈後を用いて、得られたシングルクローンの中から GLUT9L 活性の高いクローンを選択した。細胞株への GLUT9L 活性は、グルコースアナログである 2-デオキシグルコース (2-DG) を用いた。2-DG を含んだバッファーで細胞を一定時間インキュベートした後細胞を可溶化し、酵素法を用いて蛍光強度および化学発光強度を測定することで細胞内に取り込まれた 2-DG 量を算出し、細胞への 2-DG 取込活性とした。
【結果】CHO-K1 細胞へのトランスフェクション条件などを検討し、最適な条件を決定した。決定した条件を用いて GLUT9L 発現ベクターを遺伝子導入し、薬剤選抜、限界希釈後に得られたシングルクローンの 2-DG 取込活性を測定した。その中で高い 2-DG 取込活性を示した数クローンについて、さらに GLUT9 阻害剤であるベンズブロマロンを作用させ、ベンズブロマロンによって強く阻害がみられたクローンを GLUT9L 安定高発現細胞株とした。このクローンより RNA を抽出し RT-PCR をおこなったところ、ヒト GLUT9L の mRNA 発現が確認された。現在得られたクローンを用いて、GLUT9L 活性を阻害する食品成分の探索を進めている。

uric acid, transporter, kidney

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2B04a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B04 会場

マウス摘出腸管におけるキャベツ酢による糖吸収抑制作用について

Inhibitory effects of glucose absorption by cabbage vinegar on mice isolated intestines

○寺島 和哉[1]、石原 智[2]、唐木 晋一郎[3]、本間 知夫[1]([1]前橋工科大院生物工学、[2]群馬県農業技術センター、[3]静岡県立大食品栄養)
○ Kazuya TERASHIMA[1], Satoru ISHIHARA[2], Shin-Ichiro KARAKI[3], Tomoo HOMMA[1] ([1]Maebashi Inst. Technol. Grad. Sch., [2]Gunma Agric. Technol. Center, [3]Univ. Shizuoka)

【背景・目的】

群馬県で開発された「キャベツ酢」の機能性評価に関する研究の一環として、腸管機能に対する影響を調べている。昨年度の大会で、キャベツ酢が酸度依存的にマウス摘出腸管におけるグルコース吸収及びアセチルコリン誘導性の収縮運動を抑制することを報告した。比較対象として用いた穀物酢及び酢酸溶液の結果と合わせて考えると、抑制の主な要因は酢酸であると考えられた。そこで、キャベツ酢によるこれら抑制の作用機序を明らかにすることを目的として、まず本研究では、キャベツ酢には多くの未知物質が含まれていることもあり、よりシンプルな系として抑制の主要因である酢酸に絞り、グルコース吸収抑制の作用機序を明らかにすべく各種実験を実施した。

【方法】

＜糖及び酢酸吸収量の測定＞マウス(ddY、♂、5 週齢以上)より摘出した小腸を上部、中部、下部に分け(各部はさらに 3 等分した)、それぞれ反転腸管標本を作製し、10mM グルコース及び中和した酢酸溶液(0～0.7%)を含むリンガー液あるいはクレブス液に浸漬した。混合ガス(95%O_2/5%CO_2)通気下、37℃で 60 分インキュベートした後、漿膜側のグルコース濃度及び酢酸濃度をそれぞれグルコース CII テストワコー(和光純薬工業)及び F-kit 酢酸(J.K.International)にて測定した。そして腸管 1g 当たりの漿膜側への吸収量に換算した。

＜短絡電流の測定＞反転腸管標本では 60 分後の吸収量を測定しているため、より短時間での酢酸によるグルコース吸収への作用を調べるべく、摘出した小腸の粘膜-粘膜下組織標本を作製し、その間を流れる短絡電流(Isc)を Ussing-chamber 法にて測定した。

【結果及び考察】

粘膜側に酢酸が存在するとグルコースの吸収抑制が見られたが、この時酢酸は酸度依存的に漿膜側に吸収されていた。グルコースも酢酸も Na^+と共に輸送体により粘膜側から吸収される。そこで、Na^+濃度を変えてグルコース及び酢酸の吸収が競合的に起こっているか否かを調べる実験、またそれぞれの吸収に関わる輸送体の阻害剤を用いた実験などを進行中である。

グルコースの吸収に伴い Isc は直ちに変化したが、あらかじめ酢酸が投与された条件下ではグルコース投与による Isc は小さくなり、酢酸存在下では初めからグルコース吸収が抑制されることが分かった。反転腸管標本の実験結果を参考にして、Isc 測定系でも同様の実験を実施する。

cabbage vinegar, acetic acid, intestines

発表責任者：本間知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2B04a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B04 会場

ラット胸管リンパカニュレーション試験によるγ-オリザノールの腸管吸収の評価

Evaluation of intestinal absorption of γ-oryzanol by rat thoracic lymphatic cannulation test

○小林 エリ[1]、伊藤 隼哉[1]、澤田 一恵[2]、橋本 博之[2]、加藤 俊治[3]、永塚 貴弘[1]、池田 郁男[1]、宮澤 陽夫[1,4]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]築野食品工業（株）、[3]東海大医、[4]東北大未来科学技術共同研究セ)

○Eri KOBAYASHI[1], Junya ITO[1], Kazue SAWADA[2], Hiroyuki HASHIMOTO[2], Shunji KATO[3], Takahiro EITSUKA[1], Ikuo IKEDA[1], Teruo MIYAZAWA[1,4], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tsuno Food Industrial Co., Ltd., [3]Tokai Univ., [4]Tohoku Univ., NICHe)

【背景・目的】γ-オリザノール（OZ）は、植物ステロールやトリテルペンアルコールのフェルラ酸エステルの総称であり、こめ油に特徴的に含まれる機能性成分である。代表的なものに cycloartenyl ferulate、24-methylenecycloartanyl ferulate、campesteryl ferulate、β-sitosteryl ferulate がある。OZ は抗酸化作用、抗炎症作用、血中コレステロール低下作用などの優れた作用を持つことが報告されており、食を通じた健康増進への寄与が期待されている。これまで OZ がヒトの健康に及ぼす影響には多くの関心が寄せられてきたが、OZ の吸収および代謝については未だ明らかでない点が多くある。我々は最近、LC-MS/MS を用いてこめ油から調製した OZ 濃縮物を単回投与したマウスの血漿の分析を行い、投与した OZ が血漿中にそのままの形で存在することを明らかにした［1]。この結果から、従来の学説（OZ は体内で速やかにフェルラ酸に分解される）とは異なり、摂取した OZ の一部はそのままの形で腸管から吸収され、生理作用を示す可能性が示唆された。本研究では、より詳細な OZ の吸収・代謝を調べるために、ラットを用いた胸管リンパカニュレーション試験を行い、OZ の経時的なリンパ吸収率を明らかにしようとした。

【方法】はじめに、リンパ液からの OZ の抽出法と LC-MS/MS 分析法を検討し、添加回収試験により本法の定量性を評価した。次いで、SD ラット（8 週齢、雄性）を 1 週間予備飼育し、麻酔下で胸管リンパカニュレーション手術を施した。一晩回復させた後、3 mL のエマルジョンに溶解した 1 mg の OZ 濃縮物（OZ として約 700 μg）を胃に直接投与し、経時的にリンパ液を回収した。リンパ液中の OZ を LC-MS/MS を用いて定量した。

【結果・考察】リンパ液への OZ の添加回収試験の結果、それぞれの分子種の回収率は約 90%となり、リンパ液中の OZ を定量できることを確認した。実際に OZ 濃縮物をラットに投与して、リンパ液中の OZ を測定したところ、OZ はそのままの形でリンパ液中から検出され、その濃度は投与後数時間で最大となり、その後徐々に減少した。OZ 分子種ごとにリンパ液中の濃度に違いが見られた。投与した OZ の胸管リンパへの吸収率は 0.1-0.2%であり、本研究により腸管からの OZ の吸収を初めて示すことができた。現在は、代謝物のリンパ液中の濃度を調べるとともに、OZ を与えたラットの経時的な血漿中 OZ 濃度の検討を行い、更なる吸収代謝の解明を目指している。

[1] Kobayashi E., et al., *Food Funct., 7,* 4816 (2016).

γ-oryzanol, LC-MS/MS, Intestinal absorption

講演番号：2B04a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B04 会場

^{15}N 標識法を利用した 1-デオキシノジリマイシンの吸収排出動態の解明

Evaluation of absorption and excretion of 1-deoxynojirimycin using ^{15}N labeling

○高須 蒼生[1]、木村 俊之[2]、田中 福代[3]、山岸 賢治[2]、伊藤 隼哉[1]、池田 亮一[4]、宮澤 陽夫[1,5]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]農研機構食品研究部門、[3]農研機構中央農研、[4]旭松食品(株)、[5]東北大未来科学技術共同研究セ)

○So Takasu[1], Toshiyuki Kimura[2], Fukuyo Tanaka[3], Kenji Yamagishi[2], Junya Ito[1], Ryoichi Ikeda[4], Teruo Miyazawa[1,5], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), [3]Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), [4]Asahimatsu Foods Co., Ltd, [5]Tohoku Univ., NICHe)

【目的】1-デオキシノジリマイシン（DNJ）は、グルコースと類似した構造を持つアザ糖の一種である。アザ糖の中には二糖類を分解する酵素α-グルコシダーゼの活性を競合的に阻害するものがあり、その中でも DNJ は特に強力なα-グルコシダーゼ阻害活性を有している。その活性により DNJ は、血糖値の上昇を抑制し、糖尿病の予防や改善に貢献することが期待されている。DNJ は、桑などの植物や Bacillus 属、Streptomyces 属に属する一部の微生物によって生産されるが、十分な生産量を確保出来ないことが課題であった。これまでに我々は、微生物を利用して DNJ を大量生産することに成功した[1]。今後の DNJ の糖尿病予防などへの活用が期待されるが、そのためには、吸収排泄や臓器への移行蓄積などといった安全性の評価が必要である。そこで、本研究では、微生物により調製した ^{15}N ラベル化 DNJ を使用し、単回投与時の DNJ の吸収排泄動態の解明を目指した。

【方法と結果】*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 株を ^{15}N 硫安を唯一の窒素源とする合成培地で 5 日間培養後、培養上清をイオン交換樹脂に供し ^{15}N ラベル化 DNJ（純度 75%以上）を調製した。投与試験はクロスオーバー群間比較法で行った。SD ラット（雄性、6 週齢、n = 13）を一週間予備飼育後、ウォッシュアウト期間を設けつつ、水（対照群）、^{15}N ラベル化 DNJ（30 mg/kg B.W.）（DNJ 群）の順で試験を行った。絶食後試料を経口投与し、糞尿を 5 日間回収した。DNJ 群の糞尿回収終了後、屠殺し、血液および臓器を採取した。全窒素量（SUMIGRAPH NCH-22）及び窒素同位対比（ANCA-GSL analyzer）を測定し、糞尿、血液及び臓器中の ^{15}N 量を求めた。対照群と比較することで、DNJ 群の ^{15}N ラベル化 DNJ 由来の ^{15}N 量を定量し、DNJ の代謝物を含めた吸収・輸送・排泄の評価を行った。分析の結果、尿中から投与量の半分以上の DNJ 由来の ^{15}N が検出された。このことから投与した DNJ の半分以上が体内へと吸収されたと考えられる。また、投与した大部分の DNJ が 5 日後までの糞尿中に含まれていたことから、DNJ が体内への吸収後、速やかに排泄されることが明らかになった。一方で、臓器からも DNJ 由来の ^{15}N が検出され、DNJ の臓器への分布が確認された。今後は長期的に DNJ を摂取した際の臓器への蓄積などの評価を予定している。

[1] Yamagishi, K., et al., *Food Sci. Technol. Res.*, 23, 349-353 (2017)

1-deoxynojirimycin, Diabetes, α-glucosidase

講演番号：2B04a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟南 B04 会場

Lactobacillus paracasei A221 がケンフェロール配糖体の吸収性に与える影響
Effect of *Lactobacillus paracasei* A221 on absorption of Kaempferol-glucoside in vivo
○下条 洋輔[1]、小澤 裕介[2]、戸田 年彦[2]、位上 健太郎[1]、野渕 翠[1]、伊藤 久富[1]、清水 孝彦[2]([1]（株）ナガセビューティケァ、[2]千葉大学)
○YOSUKE SHIMOJO[1], YUSUKE OZAWA[2], TOSHIHIKO TODA[2], KENTARO IGAMI[1], MIDORI NOBUCHI[1], HISATOMI ITO[1], TAKAHIKO SHIMIZU[2] ([1]NAGASE BeautyCare Co., Ltd., [2]Chiba Univ.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* A221 株（乳酸菌 A221 株）は食品より分離された株で、これまでヒトでのプロバイオティクス効果が報告されている(*1)。また、ケンフェロール配糖体をアグリコンへ変換する機能を有し、配糖体成分を豊富に含むアブラナ科野菜の機能性を向上させる可能性もこれまで見出されている (*2)。今回、本乳酸菌の新たな役割としてケンフェロール配糖体の吸収性に対する影響を動物レベルの試験を中心に検討した。また、代謝変換の結果生じるケンフェロールアグリコンの抗老化作用についても併せて検証した。
【方法】アブラナ科野菜に含まれる特徴的ケンフェロール配糖体として Kaempferol-3-o-sophoroside(以下 KP3S)に着目し、当該配糖体とケンフェロール（以下 KP）の腸管上皮透過性への違いを Caco-2 腸管上皮モデルを使用し検証した。次に、C57B/6 オスマウスを用意し、KP3S (0.42mg)の単回強制経口投与、あるいは乳酸菌 A221 凍結乾燥末(25mg)との併用強制経口投与を実施し、3 時間及び 6 時間後の血中へ移行性を脱抱合後の KP の量を指標に検討した。KP の抗老化評価では、種々の老化様症状を示す SOD1 KO マウスへの強制経口投与（10mg/kg/day）を 8 週間行い、老化様諸症状に対する改善作用を評価した。
【結果】Caco-2 細胞を用いた腸管上皮モデルでの検討の結果、KP を apical 側で処理した場合、経時的に basolateral 側への移行が HPLC による分析で認められた。一方、KP3S ではそのような移行は認められなかった。次に、C57B/6 において KP3S 単独投与群、あるいは KP3S+乳酸菌 A221 併用投与群の血中移行性を HPLC 分析で検討した結果、乳酸菌 A221 併用投与群は KP3S 単独投与群と比し、投与後 3 時間において有意に血中脱抱合 KP の量が増加した。最後に、KP の SOD1 KO マウスへの経口投与の結果、皮膚の菲薄化が改善し、特に真皮の厚さが有意に改善した。また肝重量増加の抑制、赤血球数低下の抑制並びに血中 8-イソプロスタンの数値の改善が見られた。
以上より、乳酸菌 A221 株には抗老化作用を示す KP への代謝変換を通して、ケンフェロール配糖体の吸収性及び薬効を高める可能性が示唆された。
(*1) Hasegawa H and Benno Y *Journal of Traditional Medicines* 2006;23:42-46
(*2) 下条ら 第 70 回日本栄養・食糧学会 2016

Lactic acid bacteria, Flavonoid glucoside, Bioconversion

発表責任者：下条 洋輔（yosuke.shimojo@nagase.co.jp）

講演番号：2B04a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟南 B04 会場

Enhancement of a quercetin glucoside absorption by water-soluble dietary fibers in rats.

○Aphichat TRAKOONCHAROENVIT, Hiroshi HARA (Hokkaido Univ.)

Introduction Quercetin is a flavonoid and known to have many biological activities for prevention of diseases, such as cancer, cardiovascular disease, and diabetes. Quercetin usually found in fruits and vegetables as glycoside forms such as quercetin-3-*O*-beta-D-glucoside (Q3G). However, quercetin glycosides are low bioavailability, which limits their beneficial effects. We have previously demonstrated that fermentable nondigestible oligosaccharides promote Q3G absorption. However, effects of dietary fibers on flavonoid absorption have been reported limitedly.

Aim of this study Aim of this study was to investigate effects of several water-soluble dietary fibers on blood levels and urinary excretion of quercetin metabolites after feeding of Q3G in rats.

Method We performed two set experiments using male Wistar/ST rats (5 wk old). Rats were divided into six groups after 1-week acclimation with AIN93G diet, and were fed AIN93G diet as control, AIN93G with 0.5% Q3G and AIN93G including 5% acacia gum (AG) or pectin (PT) with or without 0.5% Q3G. In the second experiment, partially hydrolyzed guar gum (PHGG) and water-soluble soy fiber (WSSF) were used as fiber sources. Tail blood was collected after 2 and 4 weeks, and aortic blood and the cecum with contents were collected under an anesthesia after 4 weeks. Urine was also collected for 2 days before 2 and 4 weeks on second experiment. Concentrations of quercetin and its conjugates in blood plasma and urine were evaluated by using LC-MS/MS with or without enzymatic degradation of quercetin conjugates. Fermentation parameters were measured in the cecal contents.

Results Feeding of WSSF showed the highest increases in blood levels of total quercetin derivatives at 2 and 4 weeks. PT and PHGG also tended to increase blood levels of total quercetin derivatives at 2 and 4 weeks respectively, however AG did not have any effects. Urinary excretion of quercetin derivatives was clearly enhanced by WSSF feeding. All fiber fed groups showed lower pH in the cecal contents compared to the control group.

Conclusion We demonstrated that WSSF increase blood levels and urinary excretion of quercetin metabolites, which shows enhancement of Q3G absorption and may promote beneficial effects of quercetin. Cecal fermentation possibly contributes the promotive effects of water-soluble dietary fibers.

Absorption, Quercetin, Water-soluble dietary fibers

講演番号：2B05a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B05 会場

べにふうき緑茶と糖転移ヘスペリジンの機能性フードペアリング

Functional food pairing of green tea benifuuki and glucosyl hesperidin

○吉本 孝憲[1]、藤野 小夏[1]、篠田 有希[2]、岡田 賢次[2]、藤村 由紀[1]、立花 宏文[1]（[1]九大院農院・生機科、[2]アサヒ飲料（株））
○Takanori YOSHIMOTO[1], Konatsu FUJINO[1], Yuki SHINODA[2], Kenji OKADA[2], Yoshinori FUJIMURA[1], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Asahi Soft Drinks Co., Ltd.)

【目的】緑茶に含まれる主要なカテキンの一種である Epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は、ヒスタミン遊離抑制作用等の抗アレルギー作用を有することが報告されている。我々は EGCG とフラバノンを組み合わせることにより EGCG の生理作用が増強されることを明らかにしてきた[1)]。一方、べにふうきは吸収性及び血中での安定性に優れているメチル化カテキン Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate（EGCG3”Me）を含む茶品種であり、べにふうき緑茶の飲用は花粉症の症状を軽減する。そこで本研究では、べにふうき緑茶の抗アレルギー作用に対するフラバノンの増強効果を検討した。

【方法】ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 に対し、EGCG3”Me 及びフラバノンの一種であるヘスペレチンを単独処理または組み合わせて処理し、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性に与える影響を薄層クロマトグラフィーにて評価した。また、Balb/c マウスにおいてジニトロフェニル基を認識する IgE 抗体を耳介皮内に投与し、Evans Blue 色素を含む抗原を静脈内に注射することで受動皮膚アナフィラキシー（PCA）反応を惹起した。抗原投与前にべにふうき緑茶抽出物、糖転移ヘスペリジン、またはそれらの混合液を経口投与し PCA 反応による耳介への色素の漏出量を測定した。

【結果】RBL-2H3 細胞において高親和性 IgE 受容体からの脱顆粒誘導シグナルの伝達に重要な脂質ラフトの形成に関与する酸性スフィンゴミエリナーゼ活性に与える影響を検討したところ、ヘスペレチンは EGCG3”Me の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性化作用を増強した。また、べにふうき緑茶抽出物または糖転移ヘスペリジンをそれぞれ単独に投与したマウスにおいて PCA 反応が抑制されない条件下において、べにふうき緑茶抽出物と糖転移ヘスペリジンを組み合わせて投与したマウスにおいて PCA 反応が有意に抑制された。

【結論】糖転移ヘスペリジンを組み合わせることによりべにふうき緑茶の抗アレルギー作用が増強された。また、この増強作用に酸性スフィンゴミエリナーゼ活性に対する EGCG3”Me とヘスペレチンの相乗的な作用が関与する可能性が示された。

1) ***Scientific Reports***, **5**, 9474, 2015

Benifuuki, glucosyl hesperidin, anti-allergic effect

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B05a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B05 会場

アレルギーからの回復に対するイチジク茶の影響

The effect of fig tea on recovery from allergy

○阿部 竜也、西村 耕作、橋本 ゆかり（（公財）東洋食品研究所)
○Tatsuya ABE, Kosaku NISHIMURA, Yukari HASHIMOTO (Toyo Institute of Food Technology)

【背景・目的】当研究所の所在する兵庫県川西市は、イチジクの産地である。我々は、イチジク葉を加工したイチジク茶が I 型アレルギー抑制効果を有することを、培養細胞実験および動物実験から見出した。その抑制機構は、I 型アレルギーの発症に関与する IgE 抗体が結合した炎症細胞（感作状態）から、抗体の解離を促進し、感作前に近い状態に戻す（脱感作）ことと推察している。IgE 抗体解離促進効果を有する食品素材は新規であり、イチジク茶の利用によりアレルギーからの回復効果が得られるか検討した。

【方法・結果】ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 を用いて解離作用の持続性について調査した。感作状態の細胞に茶液を処理して抗体を解離させ、その後、抗体あるいは抗体と茶液を再添加し、炎症物質放出量を調査した。結果、抗体再添加時に茶液も添加した群の炎症物質放出量が、茶液無処理群の 50%まで抑制されたのに対し、再添加時に茶液を添加しなかった群でも放出量は 64%に抑制されていた。従って、イチジク茶の抗体解離作用は持続的であると示唆された。

NC/Nga マウスを用いて、アレルギー性皮膚炎症状からの回復効果について調査した。本試験では、耳介部の炎症を浮腫の増加量として評価した。試料は、イチジク茶あるいは蒸留水を強制経口投与した。また、試験期間の前半は抗原投与によるアレルギー惹起に対する影響を、後半は抗原投与をせず試料のみを与えて皮膚炎からの回復に対する影響を調査した。結果、抗原投与期間（前半）では、茶液投与群で炎症による腫れが抑制される傾向にあった。抗原投与をしない期間（後半）では、対照群で浮腫の増加が確認されたのに対し、茶液投与群では増加が治まり、小康状態を示すことが確認された。これらの結果は、イチジク茶がアレルギー性皮膚炎の惹起を抑制すると共に、炎症からの回復効果を有することを期待させるものであった。

fig tea, allergy, NC/Nga mouse

講演番号：2B05a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B05 会場

アレルギー性疾患モデルにおけるチシャトウおよびその含有成分の効果
Effect of stem lettuce and its several components on allergic disease model
○杉本 幸雄[1]、坪井 駿尚[1]、稲垣 勇翔[1]、武田 侑子[1]、藤本 啓太[1]、藤原 克成[1]、趙 秋娥[2]、川脇 美祐[3]、土海 ちあき[3]、我如古 菜月[3]、伊東 秀之[3]、佐伯 綾希子[4]、林 泰資[4] ([1]岡山大薬、[2]大森ヘルスケア、[3]岡山県立大、[4]ノートルダム清心女大)
○Yukio SUGIMOTO[1], Toshinao TSUBOI[1], Yuto INAGAKI[1], Yuko TAKEDA[1], Keita FUJIMOTO[1], Katsunari FUJIWARA[1], Qui e ZHAO[2], Miyu KAWAWAKI[3], Chiaki DOKAI[3], Natsuki GANEKO[3], Hideyuki ITO[3], Akiko SAIKI[4], Yasushi HAYASHI[4] ([1]Okayama Univ., [2]Ohmori Hearth Care, [3]Okayama Prefectural Univ., [4]Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】チシャトウはチシャ類（レタス、サラダナ）の一種であり、これまでの研究でアレルギー性疾患モデルマウスにチシャトウ粉末含有飼料を与えることによりアレルギー症状が抑制されることが明らかになっている。今回、チシャトウ水抽出物およびチシャトウの主な含有成分であるケルセチン、クロロゲン酸、カフェ酸およびチコリ酸について抗アレルギー作用に関する検討を行った。
【方法】アレルギー性鼻炎症状に対する効果は、BALB/c 系雌性マウスを用いてアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製し、抗原溶液もしくはヒスタミン溶液を鼻腔内投与により誘発されるくしゃみ反応および鼻掻き行動を 20 分間測定することにより評価した。また、アレルギー性皮膚疾患症状に対する効果は、ICR 系雌性マウスを用いてヒスタミン溶液を背部皮内に投与することにより誘発される後肢による背部引っ掻き行動を自動掻痒行動測定装置により 60 分間測定することで評価した。さらに、ラット腹腔マスト細胞からのコンパウンド 48/80 誘発ヒスタミン遊離反応に対するチシャトウ抽出物(葉部および茎部）およびその含有成分の効果について検討を実施した。
【結果】抗原誘発鼻炎症状に対してチシャトウ水抽出物は用量依存的で有意な抑制作用を示したが、チシャトウの含有成分であるケルセチン、クロロゲン酸、カフェ酸およびチコリ酸は抑制作用を示さなかった。一方、ヒスタミン誘発鼻症状に対してチシャトウ水抽出物およびチコリ酸は用量依存的で有意な抑制作用を示したが、ケルセチン、クロロゲン酸およびカフェ酸は抑制作用を示さなかった。また、ヒスタミン誘発掻痒行動に対してチシャトウ水抽出物は用量依存的で有意な抑制作用を示したが、ケルセチン、クロロゲン酸、カフェ酸およびチコリ酸は抑制作用を示さなかった。さらに、ラット腹腔マスト細胞からのコンパウンド 48/80 誘発ヒスタミン遊離反応に対してクロロゲン酸、カフェ酸およびチコリ酸は抑制作用を示さなかったが、チシャトウ水抽出物およびケルセチンは濃度依存的で有意な抑制作用を示した。
【考察】チシャトウは、ヒスタミンにより誘発されるアレルギー症状およびマスト細胞からのヒスタミン遊離反応を抑制することにより、様々なアレルギー症状を抑制することが示唆された。また、チシャトウの抗アレルギー作用にケルセチンおよびチコリ酸が寄与していることが明らかになったが、それ以外の物質も関与していると考えられた。

stem lettuce, allergy, histamine

発表責任者：杉本幸雄（sugimoto@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2B05a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B05 会場

西ノ島町産の褐藻ツルアラメに含まれる抗アレルギー成分の単離・同定

The identification of anti-allergic compounds derived from *Ecklonia stolonifera*, a brown alga, harvested in Nishinoshima town.

○杉浦 義正[1]、木下 陽一[2]、山谷 裕昭[3]、中西 正美[4]、平田 文久[4]、林 裕一[5]、勝崎 裕隆[6]、村瀬 昇[1] ([1]水産機構水大校、[2]西ノ島町、[3]ノア隠岐、[4]JF しまね、[5]岡部（株）海洋事業部、[6]三重大院生物資源)

○Yoshimasa Sugiura[1], Youichi Kinoshita[2], Hiroaki Yamatani[3], Masami Nakanishi[4], Fumihisa Hirata[4], Yuichi Hayashi[5], Hirotaka Katsuzaki[6], Noboru Murase[1] ([1]Natl Fish Univ, [2]Nishinoshima Town, [3]Noah Oki, [4]JF Shimane, [5]Okabe Co., Ltd., [6]Mie Univ)

【目的】近年、褐藻由来の多糖類やポリフェノール（フロロタンニン）による抗アレルギー効果の報告例がみられるようになり、我々は、島根県西ノ島町海域で採取された褐藻ツルアラメの抗アレルギー効果について実証実験を行った。その結果、フロロタンニン含量は夏季・秋季に高くなるという季節変動が認められ、モデル動物や培養細胞による抗アレルギー性評価において有効性が確認された。合わせて、フロロタンニン除去物で評価したところ有効性が消失したため、有効成分はフロロタンニン類であることが推定された [1)]。本研究では、西ノ島町産ツルアラメの機能性表示食品への利用など高付加価値化を目的とし、ツルアラメ抽出物の含有成分の単離・同定と、それら成分の抗アレルギー性評価を行った。

【方法】採取したツルアラメを完全乾燥し、粉砕機で微粉末を作製した。微粉末に対して 80%メタノール（80M）で成分抽出し、濃縮・乾固した後、100%メタノール可溶成分を試料として回収した。メタノール可溶成分を HPLC 精製（分離カラム：Develosil ODS-5、溶離：H_2O-CH_3CN 間のグラジエント、UV 検出）に供し、得られた精製物の構造は、LC-MS および NMR スペクトルから解析した。精製物の抗アレルギー効果は、炎症関連酵素 4 種（ホスホリパーゼ A_2、シクロオキシゲナーゼ-2、リポキシゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ）の活性阻害、肥満細胞モデル RBL-2H3 の脱顆粒抑制、マウス耳介浮腫の抑制により、それぞれ評価した。

【結果】ツルアラメ乾燥粉末 500 g から得られた 80M 抽出物を HPLC 精製に供したところ、3 種類の物質が単離された。LC-MS および NMR スペクトルの解析の結果、物質 3 種はフロロタンニン類である eckol、6,6’-bieckol、8,8’-bieckol とそれぞれ同定された。それらフロロタンニン 3 種は炎症関連酵素 4 種の活性いずれも抑制したので、アレルギー性炎症を抑制する可能性が見出された。また、RBL 細胞の脱顆粒に対しては、物質 3 種いずれも濃度 20 μg/mL において 80%以上抑制したので、ケミカルメディエーター放出抑制の可能性が示唆された。さらに、マウス耳介浮腫による炎症に対しては、投与量 0.1 mg/mouse において、経皮投与、経口投与いずれの場合も、有効性が認められた。

1) 杉浦ら, 平成 29 年度日本水産学会春季大会 講演要旨集, p102.

phlorotannin, *Ecklonia stolonifera*, anti-allergy

発表責任者：杉浦義正（ysugiura@fish-u.ac.jp）

講演番号：2B05a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B05 会場

Anti-allergy Effects of plantase-treated Zizania latifolia Extract in IgE-stimulated RBL-2H3 cells

○Jae-Yeul Lee[1], Seun-Ah Yang[2] ([1]Department of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, [2]Major in Food Science and Technology, Keimyung University)

Allergic disorders, such as allergic rhinitis and asthma are considered as intractable diseases threatening people's health with an increasing prevalence in recent years. There is increasing evidence that mast cells play crucial roles in the development and pathogenesis of allergic diseases. The mast cell plays a pivotal role in initiating allergic inflammation by secreting several cytokines as well as histamine. We found that *Zizania latifolia* extract suppressed β-hexosaminidase release and the production of IL-4 and TNF-α in antigen stimulated RBL-2H3 mast cells. *Z. latifolia* is the herbaceous perennial plant belonging to the *Gramineae* department, grows widely in Korea. Tricin and its derivatives, were isolated and identified as major compounds in ethanol extract of Z. latifolia by LC-MS/MS analysis. To increase extraction yield and tricin content, Z. latifolia extract was enzyme treated using plantase. In this study, we have investigated the anti-allergic action of plantase-treated *Z. latifolia* extract (ZLEP) and tricin. ZLEP inhibited the release of β-hexosaminidase (IC_{50}, 62.85 μg/mL), the formation of tumor necrosis factor-α (IC_{50}, 81.87 μg/mL), and interleukin-4 (IC_{50}, 111.30 μg/mL) in a concentration-dependent manner. In order to reveal the inhibitory mechanism of degranulation by ZLEP and tricin, we examined the activation of intracellular Lyn, MAPKs signaling proteins such as Lyn, Fyn, JNK, EKR, AKT, and p38. Therefore, these results suggest that ZLEP and tricin, maybe useful for the prevention of allergic reaction.

Zizania latifolia, Anti-allergy, Functional food

発表責任者：Seun-Ah Yang（seunahy@gw.kmu.ac.kr）

講演番号：2B05a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B05 会場

乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 による 制御性 T 細胞誘導メカニズム
A mechanism for *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 that promotes the differentiation of regulatory T cells

○顧 文亭[1]、宇野 智[1]、香西 海音[1]、森永 真実子[1]、高野 智弘[1]、平出 恵利華[1]、内田 健治[2]、鳥居 剛史[2]、元島 英雅[2]、片野 直哉[2]、足立(中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]よつ葉乳業(株)・中央研)
○Wenting GU[1], Satoru UNO[1], Amane KOUZAI[1], Mamiko MORINAGA[1], Tomohiro TAKANO[1], Erika HIRAIDE[1], Kenji UCHIDA[2], Tsuyoshi TORII[2], Hidemasa MOTOSHIMA[2], Naoya KATANO[2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Univ.Tokyo, [2]Yotsuba Milk Products)

目的

ロシアのコーカサス地方で作られる伝統的な発酵乳であるケフィアから分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780(YRC3780 株)は、マウス由来マクロファージ細胞の IL-12 の産生能を指標に、抗アレルギー作用が期待される乳酸菌としてスクリーニングされた。OVA 抗原感作したマウスを用いた試験において、YRC3780 株の摂取により血清中 IgE 抗体の有意な低下が確認されている。アレルギーは過剰な Th2 応答がその要因となるが、その緩和には Th2 応答抑制とともに、Th1 細胞や制御性 T 細胞（Treg）の誘導などの各 $CD4^+$T 細胞サブセットの分化のバランス調節が重要と考えられる。そこで、本研究では、T 細胞抗原レセプター（TCR）トランスジェニックマウス $CD4^+$T 細胞を抗原で刺激する系を用いて、YRC3780 株の Th1, Th2、Th17, Treg 誘導への効果、および Treg 誘導のメカニズムを検討した。

方法

DO11.10TCR トランスジェニックマウス脾臓細胞より MACS 法で $CD4^+$T 細胞を精製し、マイトマイシン C 処理した BALB/c マウスの脾臓細胞を抗原提示細胞として OVA 抗原および YRC3780 菌体の存在下で培養した。72 時間培養後、上清中のサイトカイン量を ELISA により測定した。また、BALB/c マウス腸間膜リンパ節（MLN）より樹状細胞として $CD11c^+$細胞、DO11.10 マウス SPL より $CD4^+$T 細胞をそれぞれ MACS 法により精製し、OVA 抗原ペプチド、YRC3780 菌体、TGF-β とともに共培養を行った。72 時間後、フローサイトメトリーにより、Treg の転写因子である Foxp3 の発現量を解析した。さらに、BALB/c マウス MLN 樹状細胞を YRC3780 菌体存在下で培養し、18 時間後、リアルタイム PCR にてインテグリン αvβ8 の遺伝子 *Itgav*、*Itgb8* の mRNA 発現量を調べた。

結果

YRC3780 を添加することで、培養上清中の IL-4 が減少し、IFN-γ と IL-12 が上昇した。また、YRC3780 添加により OVA 抗原ペプチド特異的な $CD4^+$T 細胞中の Foxp3 の発現が増加した。この培養に TGF-β を添加すると、YRC3780 菌体の効果が観察されなかった。また、樹状細胞において YRC3780 添加により、TGF-β 活性化機能を有するインテグリン αvβ8 の mRNA 発現量が増加した。これらのことから YRC3780 が Th2 サイトカインの産生を抑制、Th1 サイトカインの産生を増強し、一方で、樹状細胞に作用し、TGF-β を活性化することで $Foxp3^+$Treg の誘導を促進することが示唆された。

regulatory T cell, allergy, lactic acid bacteria

講演番号：2B05a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B05 会場

吉草酸-GPR109a 経路はエイコサノイドの産生を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する
Valerate-Gpr109a axis suppresses mast cell-mediated allergic responses by upregulating eicosanoid production.

○藤垣 泉[1]、笠倉 和巳[1]、久保 允人[2]、八代 拓也[1]、西山 千春[1] ([1]東理大基工、[2]東理大生命研)
○ Izumi FUJIGAKI[1], Kazumi KASAKURA[1], Masato KUBO[2], Takuya YASHIRO[1], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. of Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Research Institute for Biomedical Science, Tokyo Univ. of Sci.)

［目的］腸内細菌は食物繊維を代謝し、分解する際に短鎖脂肪酸 (Short-chain fatty acid; SCFA)を産生する。この SCFAs は、モノカルボン酸トランスポーターや G タンパク共役型受容体 (GPCR)を介して免疫担当細胞に作用し、免疫寛容に働く制御性 T 細胞の分化を誘導するなど、腸管免疫系の恒常性維持に寄与することが報告されている。一方、腸管をはじめ全身の粘膜や結合組織に分布し食物アレルギーなど I 型アレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞について、SCFAs の作用は未だ不明である。本研究では、マスト細胞活性化反応を抑制する SCFAs を特定し、その作用機序の解明を目指した。[方法・結果] マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC)に各種 SCFAs を添加し IgE 受容体を介した活性化反応を誘導したところ、特に吉草酸と酪酸に顕著な抑制効果が認められ、これら SCFAs の受容体が GPCR である可能性を昨年度の本大会で報告した。今回、受容体を特定するためマスト細胞で発現レベルの高い GPR109a に対し siRNA を導入したところ、酪酸による抑制が低減し吉草酸による抑制効果は完全に消失した。*Il10*$^{-/-}$マウス由来の BMMC では、酪酸、吉草酸処理による脱顆粒応答の抑制レベルが減弱し、COX 阻害効果をもつアスピリンを BMMC 培養液に添加すると吉草酸による抑制効果が消失したことから、マスト細胞の産生する抗炎症性サイトカイン IL-10 やエイコサノイド類が本抑制効果に関与すると考えられた。GPR109a はナイアシンの受容体でもあることからナイアシンについても検討した結果、脱顆粒反応が抑制され、この作用は SCFAs と同様にアスピリン処理により減弱した。マスト細胞が吉草酸添加時に PGE2 を産生すること、PGE2 存在下で脱顆粒反応が抑制されたことから、吉草酸によるマスト細胞活性化反応の抑制機構に PGE2 の関与が示唆された。吉草酸をマウスに経口投与したのち、IgE 誘導性全身性アナフィラキシーを観察したところ、抗原投与後に引き起こされる急激な体温低下が、吉草酸投与により緩和されることが判明した。この吉草酸による抑制効果は、アスピリンを飲水投与したマウスでは減弱していた。さらに、IgE 誘導性受動皮膚アナフィラキシーでは、抗原投与後に引き起こされる浮腫の肥大が、吉草酸投与により抑制されることを見出した。[まとめ] GPR109a を介した刺激がマスト細胞活性化抑制に効果的であり、吉草酸がそのリガンドとして生理的に意義のある効果を発揮することが明らかとなった。吉草酸による抑制機構には、マスト細胞自身が産生する PGE2 や IL-10 の関与が示唆された。本研究の結果から、食物繊維や短鎖脂肪酸、ビタミンといった食品成分がアレルギーの病態に関わる分子機構の一端が明らかになると共に、I 型アレルギー反応の予防・治療に GPR109a が有効な標的であることが示された。

Allergy, short-chain fatty acid, mast cell

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2B05a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B05 会場

Notch シグナルの腸管マスト細胞分化への寄与とその阻害による食物アレルギー症状の緩和

Notch signaling contributes to the differentiation of intestinal mast cells, and inhibition of Notch signaling alleviates food allergen-induced allergic symptoms in experimental food allergy

○中野 信浩[1]、本庄 明日香[1]、西山 千春[1,2]、奥村 康[1]、小川 秀興[1] ([1]順天堂大院・医、[2]東京理科大・基礎工)
○Nobuhiro NAKANO[1], Asuka HONJO[1], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

【背景】腸管粘膜のマスト細胞は粘膜型と呼ばれるタイプのマスト細胞であり、IgE 依存性食物アレルギーの主要なエフェクター細胞である。炎症時には骨髄からマスト細胞前駆細胞が動員され、腸管粘膜において粘膜型マスト細胞へと分化し、その数が急激に増加することが知られている。そのため、腸管マスト細胞数の増加を抑制することができれば食物アレルゲン摂取により誘発されるアレルギー症状を緩和できる可能性がある。しかしながら、腸管粘膜におけるマスト細胞の分化と集積のメカニズムはよくわかっていない。
【目的】粘膜型マスト細胞の分化にマスト細胞上に発現する Notch レセプターを介したシグナルが寄与していることを証明し、その阻害が食物アレルギーに伴う症状の軽減に有効であることを示す。
【方法】*In vitro* の実験系において、マウス骨髄由来マスト細胞を Notch リガンド存在下で培養し、遺伝子発現、形態、機能の変化を観察した。次に、食物アレルギーマウスモデルに Notch シグナル阻害剤 DAPT を投与し、アレルゲン摂取により誘発される症状を計測した。
【結果】骨髄由来マスト細胞を Notch リガンド存在下で培養すると、遺伝子発現プロファイルが小腸粘膜から単離した腸管マスト細胞と類似したものに変化した。さらに、細胞内ヒスタミン含有量の低下や、細胞の活性化に伴う mouse mast cell protease-1 の放出など、機能的にも腸管マスト細胞様に変化した。また、骨髄由来マスト細胞を小腸粘膜固有層構成細胞と共培養することにより粘膜型マスト細胞特異的遺伝子の発現が誘導され、この発現誘導は Notch シグナル阻害剤 DAPT 存在下で消失したことから、腸管での粘膜型マスト細胞の分化に Notch シグナルが寄与していることが示された。卵白アルブミンを感作させて作製した食物アレルギーマウスモデルに DAPT を投与すると、アレルゲンの反復経口摂取により引き起こされる腸管粘膜のマスト細胞数増加が抑制され、誘発されるアレルギー性下痢の発症率およびアナフィラキシーに伴う体温低下が軽減された。
【結論】Notch シグナルが腸管の粘膜型マスト細胞分化に寄与することが示された。Notch シグナルの阻害は腸管マスト細胞の分化を妨げ、食物アレルギーにおける腸管粘膜へのマスト細胞の集積を抑制し、アレルギー症状の緩和に有効であった。

Food allergy, Mucosal mast cell, Notch signaling

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：2B05a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B05 会場

高脂肪食食餌条件が T 細胞を介した食品アレルギー反応へ与える影響

Feeding high fat diet affects the development of T cell-mediated food allergy

○本田 真澄[1]、津田 真人[1]、高橋 恭子[1]、足立（中嶋） はるよ[2]、八村 敏志[2]、細野 朗[1]([1]日大・生資科、[2]東大院農生科・食の安全研セ)
○Masumi HONDA[1], Masato TSUDA[1], Kyoko TAKAHASHI[1], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[2], Satoshi HACHIMURA[2], Akira HOSONO[1] ([1]Nihon Univ., [2]Res.Cent.Food safety,Univ.Tokyo)

【目的】

近年食生活などの生活習慣が引き起こす様々な代謝性疾患が大きな社会問題になっている。特に脂質代謝異常を引き起こすリスクの高い高脂肪食などの過剰エネルギー摂取が、炎症性疾患の発症に関与していると考えられる。一方で、食品アレルギーは食品抗原に対する T 細胞特異的な免疫応答の過剰な反応や、腸管粘膜や末梢における炎症反応が見られるが、脂肪の過剰摂取が食品アレルギーや抗原特異的 T 細胞応答に与える影響については不明な点が多い。そこで、本研究では食品アレルギーモデルマウスである卵白オボアルブミン(OVA)特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス（OVA23-3 マウス）を用い、卵白配合飼料の給餌条件下において、高脂肪食が経口免疫寛容の誘導や腸管炎症、血中抗体価に対しどのような影響を及ぼすかを検討した。

【方法】

雄性 OVA23-3 マウスを 2 群に分け、非卵白の標準食（脂肪配合率 6%）と高脂肪食（脂肪配合率 20%）を 4 週間、その後卵白(OVA)を配合した標準食と高脂肪食を 1 週間自由摂取させた。血清中の血中抗体価、腸管のマスト細胞の活性化の指標となる mMCP1(mouse Mast Cell Protease-1)、炎症性メディエーターの PGD2(Prostaglandin D2)・PGE2(Prostaglandin E2)を測定した。また、このマウスから全身免疫系の脾臓（SP)、腸管免疫系の腸間膜リンパ節（MLN）を採取し細胞調節し、各組織由来の細胞の活性化型の CD4+T 細胞と細胞内サイトカインについて、フローサイトメトリーによって解析した。

【結果】

高脂肪食群の方が標準食群に比べて血清中の総 IgE・mMCP1 産生が抑えられている傾向が見られた。また、腸間膜リンパ節細胞においても細胞内の Th2 型サイトカイン(IL-4、IL-9、IL-13)の産生が高脂肪食摂取によって抑えられている傾向が見られた。この時、標準食・高脂肪食群の間で活性型 CD4+T 細胞（CD44high CD62lowCD4+T 細胞、CD69high CD45RBlowCD4+T 細胞）の割合には差が認められなかった。脾臓細胞の活性型 CD4+T 細胞、Th2 型サイトカインには差が認められなかった。以上から、高脂肪食条件下で飼育したのち、卵白食を摂餌して食品アレルギーを誘導することで、T 細胞を介した炎症応答の誘導を鈍化させる可能性があると考えられる。

high fat diet, T cell, inflammation

講演番号：2B05a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B05 会場

リアルタイム PCR を用いた食物アレルゲンコンポーネント解析
Component analysis of food allergen by real-time PCR

○河合 菜月[1]、岡崎 史子[2]、村上 友貴絵[3]、谷内 昇一郎[4]、西野 昌光[5]、犬尾 千聡[6]、近藤 康人[7]、松本 晋也[1]、成田 宏史[1]（[1]京女大食物、[2]龍谷大食物、[3]京都栄医専、[4]愛仁会高槻病院、[5]愛仁会千船病院、[6]聖マリアンナ医大、[7]藤田保健衛生医大）
○Natsuki KAWAI[1], Fumiko OKAZAKI[2], Yukie MURAKAMI[3], Syoichiro TANIUCHI[4], Masamitsu NISHINO[5], Chisato INUO[6], Yasuhito KONDOU[7], Shinya MATSUMOTO[1], Hiroshi NARITA[1]
([1]Kyoto Women's Univ., [2]Ryukoku Univ., [3]Kyoto Nutrition Medical College, [4]Aijinkai Takatuki HP., [5]Aijinkai Chibune HP., [6]St. Marianna Univ., [7]Fujita Health Univ.)

【目的】

卵・乳アレルギーは乳幼児に発症し寛解に至る場合が多いが、果物・野菜アレルギーは幼児期以降での発症が多く、治り難い特徴が有る。果物・野菜アレルギーは通常口腔粘膜にかゆみ等を呈する口腔アレルギー症候群（OAS）で軽症であるが、近年花粉症との関連やアナフィラキシー発症例も報告されている事から、抗原（コンポーネント）の特定が急がれている。我々は植物アレルゲンの代表と考えられていた Lipid Transfer Protein (LTP)の研究中に、そのコンタミタンパク質である Gibberellin-Regulated Protein（GRP）が LTP より強力なコンポーネントである事をモモで発見・報告して来た。今回は GRP が他の果物・野菜アレルギーにも関与している可能性を考え、以下の解析を行なった。

【方法】

花粉症、OAS、トマトによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーを併発する重症患者血清を用い、当研究室で純化したモモ、トマト GRP に対する IgE 測定を行った。また、リアルタイム PCR を用いて果物・野菜における GRP・LTP 発現量を解析した。

【結果と考察】

OAS 患者血清 24 例中に、トマト GRP と反応したものはなかったが、重症患者 3 例中 3 例ともがトマト GRP に反応を示した。このうち 1 例はモモ GRP にも同程度反応し、モモを食べただけでアナフィラキシーを起こした履歴が有った。リアルタイム PCR の結果、トマトは GRP 発現量がモモと比べて非常に低いことが判明した。したがって、GRP に感作されている場合は GRP 含量の少ないトマトを摂取しただけでは軽症ですむが、運動などの補助因子が加わることで重症化する可能性が示唆された。モモ・リンゴにおける GRP の発現は実で、LTP の発現は皮で高く、皮をむいて食べる日本においては GRP 感作が、皮のまま食べるヨーロッパでは LTP 感作が多いことと一致した。またアレルゲン登録されているウメ GRP の塩基配列にはモモのアミノ酸配列と 100%一致する配列と、一部異なる配列が報告されている。PCR 解析の結果、花ウメでは両方が、実ウメ（南高梅，古城梅）ではモモと同じ配列だけが発現されており、実ウメが食を目的としてモモに近く品種改良されて来ていることが示された。

以上のように、アレルギーの発症の理解には，臨床検査による in vitro の IgE 反応性のみならず，アレルゲンの存在量（品種、成熟度、局在）や食事状況（運動、調理・加工）などの総合的な条件を考慮する必要があることが示された。

Food allergy, Gibberellin-Regulated Protein, Real-time PCR

発表責任者：成田宏史（narita@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：2B05a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B05 会場

プロシアニジン B2 ガレートによる免疫調節作用の解析

Immunomodulatory effects of procyanidin B2 gallates

○田中 沙智、古屋 花暖、山本 佳奈、真壁 秀文（信州大農）
○Sachi TANAKA, Kanon FURUYA, Kana YAMAMOTO, Hidefumi MAKABE (Shinshu Univ.)

【背景・目的】ポリフェノールの一種であるプロシアニジン B2（PCB2）は、りんごやブドウなどに含まれており、抗酸化作用やがん増殖抑制効果が知られている。PCB2 の免疫調節機能としては、マクロファージからのサイトカイン産生を抑制し、過剰な炎症応答を制御することが報告されている。また、ガレート基を有する PCB2 は、水酸基を豊富にもつことから機能的であることが予想されるが、T 細胞からのサイトカイン産生への関与については未だ解明されていない。ヘルパーT 細胞は、IFN-γを産生する 1 型ヘルパーT（Th1）細胞、IL-4 を産生する Th2 細胞、IL-17 を産生する Th17 細胞、そして IL-10 を産生し免疫抑制能をもつ制御性 T（Treg）細胞に分類される。これらのヘルパーT 細胞サブセットに対する PCB2 ガレートの影響を明らかにすることを本研究の目的とした。
【方法】PCB2、PCB2 3-OG、PCB2 3''-OG、PCB2 3,3''-di-OG を 25 μM でマウス脾臓細胞に添加し、抗 CD3 抗体刺激下で 48 時間の培養を行い、培養上清中の IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-10 産生量を ELISA で測定した。また脾臓細胞から磁気分離法によって CD4 陽性 T 細胞を単離したときの培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定し、各サイトカインの mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。さらに、抗 CD3 抗体刺激下で各プロシアニジンを添加した脾臓細胞を用いて、細胞内染色により IFN-γ、IL-17、抗 T-bet、抗 RORγt、Foxp3 の発現を解析した。
【結果・考察】脾臓細胞からの IFN-γと IL-17 産生量は、PCB2 3,3''-di-OG の添加により抗 CD3 抗体単独刺激と比較して有意に減少したが、IL-10 産生量は変化しなかった。また、単離した CD4 陽性 T 細胞において、IFN-γと IL-4 の mRNA 発現量は PCB2 3,3''-di-OG の添加によって有意に低下し、タンパク質レベルでは IFN-γと IL-17 産生量が有意に低下したが、IL-4 と IL-10 産生に有意な影響はみられなかった。次に、PCB2 ガレートの添加で抑制された IFN-γと IL-17 について細胞内での産生レベルを評価したところ、CD4 陽性 T 細胞における IFN-γと IL-17 産生細胞割合は PCB2 3,3''-di-OG の添加により有意に低下した。さらに、IFN-γの転写因子である T-bet と IL-17 の転写因子である RORγt の発現を解析したところ、PCB2 3,3''-di-OG の添加により T-bet と RORγt の発現は有意に低下した。一方、Treg 細胞のマスター転写因子である Foxp3 の発現は PCB2 3,3''-di-OG の添加による影響を受けなかった。以上の結果から、PCB2 3,3''-di-OG は T 細胞に直接作用して T-bet および RORγt の発現を特異的に抑制し、IFN-γと IL-17 産生を制御することで、T 細胞関連疾患の改善作用をもつ可能性が示唆された。

Procyanidin, T cells, Cytokine

講演番号：2B05a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B05 会場

Caco-2 細胞における Engelhardtia chrysolepis 由来アスチルビンの腸管バリア機能の増強

Astilbin from Engelhardtia chrysolepis Enhances Intestinal Barrier Functions in Caco-2 Cell Monolayers

○中原 達雄、西谷 洋輔（丸善製薬株式会社）
○Tatsuo NAKAHARA, Yosuke NISHITANI (Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.)

【目的】アスチルビンは、フラボノイド配糖体の 1 種で黄杞（クルミ科：*Engelhardtia chrysolepis*）等の植物に含有されている。アスチルビンには、抗酸化活性、TNF-α、IL-6 等に対する抗炎症作用等があることが報告されている。腸の上皮細胞間の接着において、タイトジャンクション（TJ）タンパク質がバリアを形成すると共に物質の輸送や維持にも関与している。TJ に作用しバリア機能を高めることについて、フラボノイドのうちアグリコンでは複数の報告があるが、配糖体ではほとんど報告がない。本研究では、フラボノイド配糖体であるアスチルビンが TJ 機能にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。
【方法】黄杞の葉を 50%エタノール溶液で抽出した後、多孔性吸着樹脂、シリカゲルクロマトグラフィー、リサイクリング HPLC を使用して、繰り返し分離・精製を行い、アスチルビンを単離した。腸管バリア機能への影響を確認するために、Caco-2 細胞単層膜を用い、アスチルビン添加時と無添加時の経上皮電気抵抗（TER）値を測定した。続いて、TJ に関連するタンパク質の遺伝子発現を確認するため、リアルタイム PCR を用いて測定を行った。さらにウェスタンブロッティング法にて、TJ タンパク質の発現を確認した。次に腸管における炎症を想定し、炎症性サイトカインである TNF-α及び IFN-γを Caco-2 細胞に添加し、アスチルビンの添加時と無添加時の TER 値を測定した。また、その時の TJ 関連タンパク質発現の変化を、ウェスタンブロッティング法で確認した。
【結果・結論】Caco-2 細胞にアスチルビンを添加した時、1 時間後には TER 値が上昇し、3 時間後には最大となった。また、TJ 関連のタンパク質遺伝子発現は、クローディン-1 及び ZO-2 に有意な増加が認められた。さらに、TJ 関連のタンパク質発現において、オクルディンはアスチルビン添加 24 時間後、ZO-2 に関しては 3～6 時間後に有意な増加が認められた。次に、炎症性サイトカイン及びアスチルビン無添加のコントロール区を 100%とした場合、炎症性サイトカイン添加区の TER 値は約 62%であったが、炎症性サイトカイン及びアスチルビン添加区は約 72%に留まった。また、その際の TJ 関連のタンパク質発現は、オクルディンがコントロール区と比較して炎症性サイトカイン添加区で約 75%であったが、炎症性サイトカイン及びアスチルビンを添加区は約 94%に留まった。
以上の結果から、フラボノイド配糖体であるアスチルビンは、一部の TJ タンパク質の発現を促すことで腸管バリア機能を高める可能性が示唆された。

astilbin, caco-2, tight junction

発表責任者：中原達雄（t-nakahara@maruzenpcy.co.jp）

講演番号：2B05a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B05 会場

加齢によるマウス腸管内ケモカインとそのレセプター発現の変化

Effects of aging on the expression of chemokines and its receptors in mouse intestine

○長房 秀幸[1]、賀 軍[1]、武田 安弘[2]、茶山 和敏[1] ([1]静岡大院農、[2]森永健康栄養研)
○Hideyuki NAGAFUSA[1], Jun HE[1], Yasuhiro TAKEDA[2], Kazutoshi SAYAMA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Morinaga milk Co.)

【目的】

加齢により腸管の免疫機能が変化・低下し、軽度の慢性炎症状態が引き起こされることは広く知られているが、その機序の詳細については明らかとなっていない。ケモカインの一種である CCL25（Thymus-Expressed Chemokine ; TECK）及び CCL28(Mucosa-Expressed Chemokine ; MEC)は小腸及び大腸で発現し、CCL25 受容体である CCR9、CCL28 受容体である CCR10・CCR3 を介して免疫細胞の遊走に寄与するタンパク質であり、特に、腸管の免疫機能や炎症状態の進行に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、これらが加齢によって受ける変化や、その影響については知られていない。そこで、本研究では、老齢マウスの腸管におけるこれらのケモカイン及びケモカイン受容体、並びに炎症性サイトカイン（TNFα、IL-6、IFNγ）の発現を若齢マウスと比較した。

【方法】

メス C57BL/6NCrSlc 若齢マウス（12 週齢）及び老齢マウス（78 週齢）を解剖し、回腸及び結腸を摘出した後、リアルタイム PCR 法により CCL25,CCL28,CCR9,CCR3,CCR10,TNFα,IL-6,IFNγ の遺伝子発現を測定し、若齢マウスの発現量を 1 として、相対定量を行った。また、免疫染色によって小腸の CCL25 の発現を比較した。

【結果及び考察】

老齢マウスの小腸において CCL25 の発現が有意に減少し、大腸において有意に増加した。また、CCL28,CCR9,CCR10,IL-6 の発現は小腸および大腸の両方で有意に増加していた。さらに、CCR3 の発現は老齢マウスの大腸において有意に増加した。一方、小腸内の CCL25 のタンパク発現を免疫染色で確認した結果、その陽性反応が老齢マウスで顕著に低下していた。CCL25 と CCL28 は、炎症状態のヒト腸管において発現が増加することが知られている。また、腸管の免疫細胞のうち、一部の T 細胞は、老齢マウスにおいて増加することが報告されている。従って、大腸では、加齢に伴って生じた炎症によって CCL25 と CCL28 の発現が増加し、それによって各種レセプターを発現する免疫細胞が腸管に誘引された可能性が考えられた。一方、小腸においては CCL25 の発現が減少していた。そのため、加齢によって受ける影響、特に免疫機能やそれに伴う炎症、腸内細菌叢のバランスなどの老化による変化が小腸と大腸で異なることが考えられた。現在、両ケモカインの免疫染色およびウエスタンブロッティングによるタンパク質の定量などの、より詳細な検討を行っている。

immunosenescence, intestinal immunity, CCL25 and CCL28

発表責任者：茶山和敏（sayama.kazutoshi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B05a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟南 B05 会場

光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発
Development of an easy-to-use optical sensing system for evaluating in vivo antioxidant capacity
○數村 公子[1]、竹内 康造[1]、波多野 薫子[1]、土屋 広司[1]、美和 登志幸[1]、服部 将貴[2]、森下 直計[3]、近藤 房宣[3]、大澤 俊彦[4]([1]浜松ホトニクス・中研、[2]浜松ホトニクス・開発本部、[3]浜松ホトニクス・電子管、[4]愛知学院大・心身)
○Kimiko KAZUMURA[1], Kozo TAKEUCHI[1], Yukiko HATANO[1], Hiroshi TSUCHIYA[1], Toshiyuki MIWA[1], Masaki HATTORI[2], Naokazu MORISHITA[3], Fusanori KONDO[3], Toshihiko OSAWA[4] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Hamamatsu Photonics DEV, [3]Hamamatsu Photonics ETD, [4]Fac. of Psychological and Physical Sci., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】酸化ストレスは生活習慣病や老化の原因と考えられており、食事由来の抗酸化成分による改善が期待されている。「食」を摂取した後の生体内での真の効果が判別できる簡便法として、我々は酸化ストレスの原因となる好中球の過剰活性化を光センシング技術により評価できる手法を開発している。昨年度は本学会等で、より高精度化した新しいシステムを紹介し、運動による影響等についての評価結果を報告した。今回は、健常者ボランティアの数か月にわたる日間変動を評価し、変動要因についても検討を行った結果を報告する。
【方法】好中球の活性化指標となるスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）産生とミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を、$O_2^{\cdot-}$検出用化学発光試薬 MCLA による化学発光と、次亜塩素酸イオン（OCl^-）検出用蛍光試薬 APF による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を開発した。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系として新たにディスポーザブルの樹脂製角型計測セルと計測装置を開発した。本システムを用いて、健常者ボランティア 6 名（30 歳代、40 歳代、50 歳代の男女各 1 名）の日間変動の評価を実施した。10 時間以上絶食状態での測定として、食事による影響を排除した。同時に、血球計数 CRP 測定装置にて好中球数や CRP 値の測定も行った。
【結果】日間変動範囲は生活習慣の規則性に関連があることが示唆され、また年齢に比例して、$O_2^{\cdot-}$産生と MPO 活性共、高くなる傾向が見られた。一方、性差による違いは今回の試験では見られなかった。また過去の研究報告と同様に、計測日前の運動による好中球活性の有意な亢進も観察された。さらに、感冒症状による影響と考えられる日間変動範囲を超える有意な変動が観察された。現在解析を進めているが、興味深いことに好中球数の変動とは必ずしも一致していない場合もあり、また $O_2^{\cdot-}$産生よりも MPO 活性の方が、変動要因に関連する変化を反映していると示唆された。
今後、未病マーカーとしての利用を目指して、年齢や性別だけでなく個人差につながると考えられる要因（睡眠や喫煙、食生活等生活習慣）による影響についても従来マーカーの比較と共に明らかにしていきたい。
本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：農研機構 生研支援センター）によって実施された。

in vivo, antioxidation, innate immune response

発表責任者：數村 公子（kimiko-k@crl.hpk.co.jp）

講演番号：2B05a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟南 B05 会場

腸管上皮細胞における TLR4 遺伝子の DNA メチル化誘導機構
Regulatory mechanisms for DNA methylation of TLR4 gene in intestinal epithelial cells
○楢林 ひかり、添田 譲、倉岡 克弥、中田 一彰、中西 祐輔、花澤 重正、高橋 恭子（日大生物資源）
○Hikari Narabayashi, Jo Soeta, Katsuya Kuraoka, Kazuaki Nakata, Yusuke Nakanishi, Shigemasa Hanazawa, Kyoko Takahashi (Nihon Univ.)

[背景・目的]
これまでに、腸管上皮細胞(IEC)の腸内細菌に対する低応答性獲得システムとして TLR4 遺伝子の DNA メチル化による発現抑制を報告している。また、TLR4 遺伝子の DNA メチル化は陰窩の IEC では見られず、絨毛の頂端側の IEC に見られることから *de novo* メチル化酵素が関与している可能性が高い。本研究では、IEC における TLR4 遺伝子への DNA メチル化誘導メカニズムについて明らかにすることを目的とした。このために、5'領域の CpG モチーフに高頻度のメチル化が認められ、TLR4 の発現がほとんど検出されないヒト IEC 株 Caco-2 および HCT116 と、メチル化が低レベルで TLR4 を発現するヒト IEC 株 SW480 をモデルとして用いて解析を行った。
[方法]
ヒト IEC 株 Caco-2, HCT116, SW480 より総 RNA を抽出し、*de novo* メチル化酵素である DNMT3a 及び DNMT3b の mRNA 発現を RT-PCR により解析した。
また、Caco-2, HCT116, SW480 から調製した核抽出物を用い、DNMT3a、DNMT3b に対する抗体を用いてそれぞれ免疫沈降を行った。回収したメチル化酵素結合因子を SDS-PAGE 後に銀染色に供した。TLR4 高発現株 SW480 に比べて低発現株 Caco-2 および HCT116 で顕著に検出されたバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化後、MS による解析を行った。
[結果・考察]
ヒト IEC 株において、DNMT3a の mRNA 発現は Caco-2≫SW480＞HCT116 の順であり、DNMT3b の mRNA 発現は Caco-2≫HCT116＞SW480 の順であった。よって TLR4 遺伝子の DNA メチル化頻度との相関は見られなかった。そのため、IEC における TLR4 遺伝子の DNA メチル化の誘導は、*de novo* メチル化酵素の発現制御によるものではないと考えられた。よって、TLR4 遺伝子の 5'領域に *de novo* メチル化酵素をリクルートする仲介因子が機能している可能性が考えられた。Dnmt3b 抗体を用いた免疫沈降において、TLR4 低発現株にのみ特異的に検出される結合因子がいくつか確認され、これらの因子が Dnmt3b のリクルートに関わる可能性が考えられた。今後、これらの因子について、TLR4 遺伝子の DNA メチル化の誘導への関与を解析中である。

TLR4, intestinal epithelial cells, DNA methylation

発表責任者：高橋　恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B05p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B05 会場

Lactococcus lactis JCM 5805 経口投与による皮膚免疫活性化と黄色ブドウ球菌感染防御効果
oral administration of *Lactococcus lactis* JCM 5805 affects on skin immunity and *Staphylococcus aureus* infection.

○辻 亮平[1]、藤井 敏雄[1]、谷澤 かみゆ[1]、山田 小百合[1]、松岡 悠美[2]、金内 理[1] ([1]キリン(株)健康研、[2]千葉大医)
○Ryohei TSUJI[1], Toshio Fujii[1], Kamiyu Yazawa[1], Sayuri Yamada[1], Yuumi Matsuoka[2], Osamu Kanauchi[1] ([1]KIRIN Co., Ltd., [2]Chiba Univ.)

【背景】*Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM 5805 株(プラズマ乳酸菌)はプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)を直接活性化し、インターフェロン(IFN)-αを始めとした各種サイトカインの産生を誘導する乳酸菌である。これまでに動物およびヒトにおいて、pDC を活性化すると共に免疫賦活作用があることを様々な観点から確認している(*)。また、老化促進マウスにプラズマ乳酸菌を長期投与すると、皮膚の薄化の抑制など、皮膚の表現型にも影響を与えることが確認された。本試験では、プラズマ乳酸菌の経口投与が皮膚免疫系に与える影響を検証することを目的とした。
【方法】BALB/C マウスに対してプラズマ乳酸菌を 1 mg/day となるように 2 週間混餌投与した後に、背部を除毛して露出させ、*Staphylococcus aureus* MW2 株を感染させ、48 時間後に解剖し、皮膚の外観スコア評価(丘疹およびびらんの程度を点数化)、皮膚の病理切片評価および *S. aureus* の感染させた皮膚部位中の菌数測定を行った。また、プラズマ乳酸菌を 2 週間経口投与した BALB/C マウスの皮膚所属リンパ節(SLN)の樹状細胞(DC)の細胞表面マーカーの発現および皮膚中のタイトジャンクション(Tj)遺伝子や抗菌ペプチド(AMP)遺伝子の発現を調べた。
【結果】*S. aureus* の感染実験において、プラズマ乳酸菌群で皮膚の外観スコアが有意に改善されていた。病理解析の結果、かさぶた・表皮肥厚などの項目で有意な改善を認めた。さらに、*S. aureus* の増殖が有意に抑制されていた。この *S. aureus* 増殖抑制と皮膚状態改善のメカニズムを探ることを目的として、SLN の DC 活性を調べたところ、コントロール群と比較して、プラズマ乳酸菌群で pDC の有意な活性化およびミエロイド樹状細胞(mDC)の活性化傾向を確認した。また、皮膚中の *Cldn-1* や *Zo-1* などの Tj 遺伝子や *β-defensin 1* や *S100A8* などの AMP 遺伝子の発現がプラズマ乳酸菌群で有意に亢進していることが明らかとなった。
【考察】以上の結果から、経口投与したプラズマ乳酸菌は SLN の DC を活性化し、皮膚のバリア機能や抗菌作用を増強することで、*S. aureus* への感染防御および皮膚炎を軽減する効果を有することが示唆された。
【引用文献】
(*): Jounai *et al.*, PLoS One 2012. 7(4): e32588 他

Lactococcus lactis JCM 5805, skin immunity, bacterial infection

発表責任者：辻　亮平（Ryohei_Tsuji@kirin.co.jp）

講演番号：2B05p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B05 会場

Lactococcus lactis JCM 5805 含有食品摂取が健常な成人皮膚へ及ぼす効果
The effect of oral administration of *Lactococcus lactis* JCM 5805 on skin condition of healthy volunteers

○藤井 敏雄[1]、藤友 崇[2]、辻 亮平[1]、加藤 悠希子[1]、澤井 典子[2]、松岡 悠美[3]、植松 智[4]、金内 理[1]([1]キリン株式会社健康技術研究所、[2]DeNA ライフサイエンス、[3]千葉大学医学部皮膚科、[4]千葉大学大学院医学研究院・粘膜免疫学)
○Toshio FUJII[1], Takashi FUJITOMO[2], Ryohei TSUJI[1], Yukiko KATO[1], Noriko SAWAI[2], Yumi MATSUOKA[3], Satoshi UEMATSU[4], Osamu KANAUCHI[1] ([1]Research Laboratories for Health Science & Food Technologies, Kirin co.ltd., [2]DeNA Life Science Inc., [3]Department of Dermatology, Chiba University Graduate School of Medicine, [4]Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University)

【背景】*Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM 5805 株(プラズマ乳酸菌)はプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)を直接活性化し、インターフェロン(IFN)-αを始めとした各種サイトカインの産生を誘導する乳酸菌である。前報で示したように、プラズマ乳酸菌のマウス経口投与により、タイトジャンクション（Tj）遺伝子群や抗菌ペプチド(AMP)遺伝子群の発現亢進および、黄色ブドウ球菌 *S. aureus* の感染抑制が確認された。そこでヒトにおける、プラズマ乳酸菌摂取の皮膚への影響を評価するために、プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。
【方法】30 歳から 60 歳までの健常な男女 70 名を募集した。事前検査と背景調査表をもとに、性別、pDC 活性、および皮膚水分量の有意差がつかないよう、被験者を２群に分け、1 日当たりプラズマ乳酸菌約 1000 億個を含有するカプセル 1 個(プラズマ群)、もしくは対照カプセル 1 個(対照群)を 8 週間摂取させた。摂取期間中は、他の乳酸菌含有食品の摂取を禁止した。試験食品摂取前後で皮膚細菌叢を採取し、次世代シークエンサーで解析した。また被験者毛根より、RNA を抽出し、Tj 遺伝子群、AMP 遺伝子、免疫関連遺伝子などの発現量を比較した。さらに経表皮水分蒸散量、水分含量、色差測定を行った。
【結果・考察】皮膚細菌叢解析で、菌属レベル、菌種レベルの占有率とその変化を検討したところ、占有率が変化した菌属、菌種数が対照群において、プラズマ群より約 10 倍多かった。また対照群において皮膚の主要な菌種であり、善玉菌とされる *Staphylococcus epidermidis* の占有率が摂取前後で低下する傾向がみられたが、プラズマ群では変化が見られなかった。このことから、プラズマ乳酸菌摂取は皮膚細菌叢の恒常性を維持し、環境変化による皮膚菌叢の変動を抑制する効果があることが示唆された。また、毛根鞘の遺伝子発現解析に関しては、プラズマ群において、測定した 7 種類の Tj 遺伝子群のうち、*CLDN1, CLDN12, ZO1* の摂取後の有意な発現上昇が認められた。また、AMP 遺伝子群の発現解析では、プラズマ群において *BD3* の摂取後の有意な増加が認められた。さらにプラズマ群において、免疫遺伝子である *TGFB1* の摂取後の有意な発現低下が確認された。*TGFB1* は群間比較においても、プラズマ群が対照群に比較して 8 週の摂取期間後に有意に低くなった。
以上のことから、動物試験同様、ヒトにおいてもプラズマ乳酸菌摂取が、Tj 遺伝子群や 1 部の AMP 遺伝子群の発現に影響を与えること、皮膚の菌叢の恒常性を保つことや、さらに皮膚免疫因子に作用することが示唆された。

Lactococcus lactis JCM 5805, skin immunity, microbiome

発表責任者：藤井　敏雄（tfujii@kirin.co.jp）

講演番号：2B05p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B05 会場

味噌より分離した *Tetragenococcus halophilus* の免疫調整機能
Effect of *Tetragenococcus halophilus* isolated from miso on the immune system
○熊澤 利彦[1,2]、西村 篤寿[1]、浅井 紀之[1]、安達 貴弘[2] ([1]イチビキ（株）、[2]東京医科歯科大・難研)
○ Toshihiko KUMAZAWA[1,2], Atsuhisa NISHIMURA[1], Noriyuki ASAI[1], Takahiro ADACHI[2] ([1]Ichibiki Inc., [2]Tokyo Medical and Dental Univ.)

【背景・目的】未病を防ぎ、疾患にかかりにくくするには、免疫バランスの恒常性維持が重要な要素の一つであり、免疫機能を調整する食品素材を日々の食事で摂取し維持できれば簡便かつ効率的である。乳酸菌は、様々な菌種で免疫に関与することが報告されている。また、免疫細胞のうち B 細胞は液性免疫に中心的な役割を果たし、唯一の抗体産生細胞である。B 細胞を直接刺激する能力を有すれば免疫調節機能に有効であると考え、日本の伝統的発酵食品である味噌の乳酸菌から探索を行った。
【方法】味噌より耐塩性乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）を分離、培養、洗浄、殺菌を施して乳酸菌（殺菌）菌体を得た。これらの乳酸菌菌体は実験用マウスの脾臓由来の B 細胞と 2 日間共培養した。フローサイトメトリーにて生細胞の存在割合及び、B 細胞中の $CD86^+$細胞の割合を測定し、それぞれを B 細胞の生存能、B 細胞の細胞活性化能として両活性の高い乳酸菌を選択した。次に、スクリーニング優良株の乳酸菌菌体をマウス全脾臓細胞と共培養して、B 細胞の生存能及び細胞活性化能、T 細胞の生存能と細胞活性化能（T 細胞中の $CD69^+$細胞の割合）の解析と、サイトカイン産生細胞を解析した他、マイクロアレイ解析を実施した。更に、乳酸菌（殺菌）菌体を配合した飼料を正常マウスに給餌し、2 週間後の血清中の総 IgA 濃度を ELISA 法により測定した。
【結果・考察】味噌より分離した耐塩性乳酸菌のうち、B 細胞との共培養で B 細胞の生存能及び細胞活性化能の両方を高める株を選択し、最良株を蔵華乳酸菌 LTK-1 とした。LTK-1 株を含む優良株は、全脾細胞との共培養では、B 細胞の生存能及び細胞活性化能の両方を高めた他、T 細胞の生存能及び細胞活性化能も高めた。また、LTK-1 株のマイクロアレイ解析では、B 細胞での CD86、CD70 の遺伝子発現を増加させた他、IFN-γ、IL-10、IL-22 の遺伝子発現も増加させた。これらのサイトカインは B 細胞中でそれぞれ別の細胞より産生されるが、全脾細胞との共培養では、B 細胞中のこれらのサイトカイン産生細胞が増加し、細胞全体でも増加した。また、LTK-1 株を正常マウスに給餌すると血清中の総 IgA 濃度が有意に増加した。これらの結果より LTK-1 株は B 細胞に直接作用する能力を有し、B 細胞や T 細胞の生存能及び細胞活性化能を向上させ、IFN-γ産生や血清中の IgA 濃度を高めることで免疫賦活化能を向上させる一方、IL-10 が不適切な免疫反応を抑制する機能を発揮し、IL-22 が腸管のバリア機能を高めることが考えられることから、免疫系全体をバランス良く機能させ、病原体などに対する適切な免疫応答を高めることが期待できる。

Lactic acid bacteria, Miso, Immunomodulation

講演番号：2B05p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B05 会場

OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトが発揮する免疫賦活作用のメカニズム解析

Mechanisms of immunostimulatory effects exereted by yogurt fermented with strain OLL1073R-1

○牧野 聖也[1]、千葉 芳香[1]、竹田 和由[2]、狩野 宏[1]([1]株明治　乳酸菌研、[2]順天堂大医)
○SEIYA MAKINO[1], YOSHIKA CHIBA[1], KAZUYOSHI TAKEDA[2], HIROSHI KANO[1] ([1]Meiji Co. Ltd., [2]Juntendo Univ.)

健常高齢者を対象とした摂取試験において、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1（OLL1073R-1 株）で発酵したヨーグルトは NK 活性を増強し、風邪症候群への罹患リスクを低減した（Makino *et al. Br. J. Nutr.* 2010）。また、本ヨーグルトはマウスを用いた検討において抗インフルエンザ活性を発揮し、その主な有効成分は OLL1073R-1 株が産生する菌体外多糖（EPS）であることが示唆されている（Nagai *et al. Int. Immunopharmacol*. 2011）。本研究は、OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトが免疫賦活効果を発揮するメカニズムを明らかにすることを目的に行った。

OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルト、OLL1073R-1 株が産生する EPS は、いずれも IFN-γノックアウトマウスでは NK 活性増強効果を発揮しないことから、EPS による NK 活性増強効果には IFN-γの産生誘導が重要であると考えられる（Makino *et al. J. Dairy Sci.* 2016）。そこで、マウスに経口投与した EPS がいずれの組織においてどのようなタイミングでどのような細胞に IFN-γの産生を誘導するのかについて IFN-γレポーターマウスを用いて検討を行った。その結果、EPS を経口投与した 24 時間後の小腸ラミナプロプリア、腸間膜リンパ節、脾臓において、EPS 投与群では蒸留水投与群に比べて IFN-γ陽性の NK 細胞の割合に有意な増加が認められた。

次に、ヨーグルト中の EPS 含有量を高めることで免疫賦活効果がさらに高まるかを検証するために、発酵法を工夫することで従来よりも EPS 含有量が高いヨーグルトを 2 種類調製した。これらのヨーグルトをマウスに 3 週間経口投与した結果、いずれも従来の OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトに比べて強い NK 活性増強効果を発揮した。また、ヨーグルトの EPS 含有量と NK 活性との間には正の相関が認められた。

これらの結果から、OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトが発揮する免疫賦活効果の主な有効成分は EPS であり、EPS は小腸から吸収された後、腸管の NK 細胞を活性化し、その影響が比較的早期に全身に波及すると考えられた。また、OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトを摂取したマウスの NK 活性とヨーグルトの EPS 含有量には正の相関が見られたことから、今後、EPS 含有量をさらに増量させることで、免疫賦活効果がより高いヨーグルトが開発できる可能性がある。

Yogurt, NK, EPS

発表責任者：牧野　聖也（seiya.makino@meiji.com）

講演番号：2B05p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B05 会場

免疫賦活能を有する *Leuconostoc mesenteroides* 由来菌体外多糖の合成に関わる酵素の遺伝子解析と機能解析

Analysis of glycosyltransferases involved in synthesis of immunostimulatory exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides*

○松崎 千秋[1]、中島 由香里[1]、青木 美優[1]、苫米地 祐輔[2]、糸乗 前[3]、山本 憲二[1]、久 景子[4]([1]石川県大資源研、[2]東海大工、[3]滋賀大教育、[4]日東薬品工業)
○Chiaki Matsuzaki[1], Yukari Nakashima[1], Miyu Aoki[1], Yusuke Tomabechi[2], Saki Itonori[3], Kenji Yamamoto[1], Keiko Hisa[4] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Tokai Univ., [3]Shiga Univ., [4]Nitto Pharm. Ind. Ltd.)

【目的】我々は野菜やその漬物から単離した乳酸菌 173 株より選抜した *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 の産生する菌体外多糖（EPS）が、IgA 産生誘導を介して粘膜免疫を増強することを、マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 試験において明らかにしている（*J. Appl. Microbiol.* 2014, *J. Agric. Food Chem.* 2015)。また、EPS の分子構造をα-1,6 結合の主鎖にα-1,3 結合の側鎖を有するグルコース鎖、β-2,1 結合したフルクトース鎖、およびβ-2,6 結合したフルクトース鎖であることを明らかにしている（*Carbohydr. Res.* 2017)。本研究では、EPS 合成に関わる *Leu. mesenteroides* NTM048 株の多糖合成酵素について、その遺伝子クローニングと機能解析を試み、酵素によって生産された多糖の粘膜免疫賦活活性を調べた。
【方法】*Leu. mesenteroides* NTM048 のドラフトゲノム解析から、EPS の合成に関わると推測される GH ファミリー68 および 70 に属する酵素の遺伝子を 3 つ見出した。ゲノムより遺伝子コード部位を増幅、pET23b を用い BL21(λDE3)にて目的の酵素遺伝子を発現させ、His-Tag カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーにて組換え酵素を精製した。得られた組換え酵素を用いて、50mM Sucrose、0.1mM $CaCl_2$、100mM Sodium Acetate (pH 5.2) 存在下で 28℃、4 時間反応して、多糖を合成した。可溶性多糖の精製は、10% TCA にてタンパク除去後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて多糖画分を回収し、凍結乾燥した。不溶性多糖については、反応液を遠心後、沈殿を超純水で 2 回洗浄し、凍結乾燥した。各酵素によって合成した多糖について、PMAA 法によって誘導体化した試料を GC-MS にて分析し、構成糖と結合様式を解析した。
【結果】*Leu. mesenteroides* NTM048 の EPS 合成に関わる酵素遺伝子として、2 つのグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子（*gtf1*、*gtf2*）および 1 つのフルクトシルトランスフェラーゼ遺伝子（*ftf1*）を見出し、遺伝子クローニングしてそれぞれの組換え酵素を精製し、それら酵素を用いて合成した多糖について結合様式を解析したところ、2 種のグルコシルトランスフェラーゼは、それぞれ異なった構造のグルコース鎖を合成していることが明らかとなった。すなわち Gtf1 により合成された多糖はα-1,6 結合したグルコースの主鎖にα-1,3 結合の短いグルコース鎖が結合した構造であるのに対し、Gtf2 により合成された多糖はα-1,6 結合したグルコースの主鎖に長鎖のα-1,3 結合のグルコース鎖が側鎖として結合した構造であった。

exopolysaccharide, *Leuconostoc mesenteroides*, glycosyltransferase

発表責任者：松崎千秋（chiaki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2B05p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B05 会場

Lactobacillus plantarum OLL2712 株による腸管免疫系樹状細胞における IL-10 産生誘導効果
Inducing effect of *Lactobacillus plantarum* OLL2712 on IL-10 production by dendritic cells of the intestinal immune system

○遠藤 龍之助[1]、高野 智弘[1]、WANG YIMEI[1]、利光 孝之[2]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]（株）明治・研究本部 乳酸菌研)
○Ryunosuke ENDO[1], Tomohiro TAKANO[1], Yimei WANG[1], Takayuki TOSHIMITSU[2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Research Center for Food Safety, The University of Tokyo, [2]Food Microbiology Research Laboratories, Meiji Co.)

【目的】抗炎症性サイトカインの IL-10 は、慢性炎症や代謝疾患の改善に重要であると考えられている。一方、生体に有益な影響を及ぼす微生物として乳酸菌が注目されており、免疫系への作用が多く報告されている。*Lactobacillus plantarum* OLL2712 株は、骨髄由来樹状細胞および腹腔マクロファージにおいて高い IL-10 産生誘導能が示されている。菌体を経口摂取した場合、実際に作用するのは腸管免疫系であるため、本研究では腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node; MLN）やパイエル板（Peyer's patch; PP）由来の樹状細胞（dendritic cell; DC）を用い、*L. plantarum* OLL2712 株による腸管由来 DC の IL-10 産生誘導能に対する作用について検討した。
【方法】BALB/c マウスの MLN、PP 細胞より MACS 法にて $CD11c^+$細胞を精製し、それぞれ MLN DC、PP DC として用いた。得られた各 DC を *L. plantarum* OLL2712 株の凍結乾燥菌体存在下で培養し、18 時間後の各 DC の IL-10 mRNA 発現量を qPCR 法により定量した。また 72 時間培養後の培養上清中のタンパク質量を ELISA 法により定量した。さらに BALB/c マウスを対照群、乳酸菌単回投与群、乳酸菌 6 回投与群に分け、乳酸菌投与群には *L. plantarum* OLL2712 株の凍結乾燥菌体を懸濁液として胃ゾンデにより 1 回あたり 2 mg 投与し、対照群には滅菌水を 6 回投与した。投与終了後 MLN、PP から得られた細胞から $CD11c^+$細胞を精製し、各細胞の mRNA 発現量を qPCR 法により定量した。
【結果】*in vitro* の系において MLN DC、PP DC では *L. plantarum* OLL2712 株を添加することで、IL-10 mRNA 発現量が IL-10 タンパク質産生とともに増加した。*in vivo* の系において乳酸菌 6 回投与群の MLN DC によって IL-10 mRNA 発現量の増加が見られた。本研究により *L. plantarum* OLL2712 株の腸管免疫系 DC における IL-10 産生誘導能が示され、経口摂取による慢性炎症や代謝疾患の改善作用の可能性が示唆された。現在、腸管免疫系から脂肪組織への影響に着目して解析を進めている。

lactic acid bacteria, IL-10, dendritic cell

講演番号：2B05p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B05 会場

Pediococcus acidilactici K15 株のヒト B 細胞に対する IgA 産生誘導効果
Pediococcus acidilactici K15 activates IgA production by Human B Cells.

○碇 菜穂[1]、川島 忠臣[1]、久保田 芳郎[2]、小渡 康行[3]、下条 直樹[4]、辻 典子[5]([1]キッコーマン（株）研究開発本部、[2]キッコーマン（株）キッコーマン総合病院、[3]（公財）愛世会愛誠病院　上野クリニック、[4]千葉大院　医学研究院　小児病態学、[5]産総研　バイオメディカル研究部門)
○Naho IKARI[1], Tadaomi KAWASHIMA[1], Yoshiro KUBOTA[2], Yasuyuki KOWATARI[3], Naoki SHIMOJO[4], Noriko M TSUJI[5] ([1]Kikkoman Corp., [2]Kikkoman General Hospital, [3]Aisei Hospital, [4]Chiba Univ., [5]AIST)

【背景】
発酵食品や腸内細菌由来の乳酸菌はヒトの健康に様々な良い効果をもたらすことが知られている。近年では乳酸菌が自然免疫と獲得免疫の双方を活性化し、菌やウイルス感染を防ぐことが報告されてきた。乳酸菌は樹状細胞からの I 型のインターフェロン（IFN）産生を誘導したり、粘膜面から抗体の分泌を誘導したりすることで腸管での免疫バリア構成に寄与している。我々はこれまでに、乳酸菌の菌体内 2 本鎖 RNA がエンドソームのトル様受容体を刺激することで mDC からの IFN-β産生を亢進することを示してきた（Kawashima T *et al, Immunity.* 2013;38:1187-97.）。今回は、ヒト由来細胞を用いて乳酸菌の B 細胞からの IgA 産生誘導メカニズムを検証するとともに、乳酸菌摂取がヒトの IgA 産生に与える影響も評価した。

【方法】
ヒトの血液から末梢血細胞（PBMC）を単離後 $CD19^+$細胞を分離し、B 細胞を得た。同じく PBMC から $CD19^-CD1c^+$細胞を単離し、mDC1 を得た。PBMC、もしくは B 細胞と mDC1 を、それぞれ乳酸菌の加熱菌体と共培養し、培養上清中の IgA 濃度を ELISA 法により測定した。また、共培養時に抗 IL-5 / IL-6 / IL-10 中和抗体を添加することで、IgA 産生誘導に関与するサイトカインを調べた。さらに、ぬか床由来乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* K15 株（以下、K15）を 12 週間摂取することが唾液中の分泌型 IgA 濃度に及ぼす影響について、二重盲検比較試験を実施した。

【結果と考察】
PBMC からの IgA 産生が複数の乳酸菌株により亢進したが、中でも K15 は IgA 産生を強く誘導した。また、mDC1 と B 細胞の共培養系により、B 細胞からの IgA 産生誘導には樹状細胞が誘導する IL-6 と IL-10 が寄与することがわかった。この IL-6 と IL-10 の産生誘導には、K15 菌体内の 2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA がそれぞれ関与していることも明らかとなった。さらに、臨床試験においては、プラセボ群で唾液中分泌型 IgA 濃度の変化が見られない一方、K15 摂取群では摂取前に比べて唾液中分泌型 IgA 濃度が有意に高くなっていた。以上から、乳酸菌は樹状細胞からの IL-6、IL-10 産生を誘導することで、ヒトの粘膜面における分泌型 IgA 濃度を高めることが示唆された。

IgA, Lactic acid bacteria, RNA

講演番号：2B05p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B05 会場

カタクリ草（*Erythronium japonicum* Decne.）によるマクロファージにおける炎症抑制作用の遺伝子発現解析

Erythronium japonicum Decne. Suppresses anti-inflammatory gene expression in RAW264.7 macrophage-like cells

○岩間 直子[1]、小堀 真珠子[2]、本多 和茂[3]([1]（地独）青森産技セ弘前研、[2]（国研）農研機構食品研、[3]弘前大農学生命)
○Naoko IWAMA[1], Masuko KOBORI[2], Kazusige HONDA[3] ([1]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, [2]Food Research Institute,NARO, [3]Hirosaki Univ.)

【背景と目的】

カタクリ草（*Erythronium japonicum* Decne.）は国内で広く生育分布がみられるユリ科植物で、その球根は、古来より良質なデンプン原料として片栗粉の製造に用いられてきた。特に青森県では多くの群生地が存在し、葉部分も山菜として伝統的に食習慣がある。しかし、これまでに生理機能性についてはあまり明らかにされてきていない。これまでに我々は、青森県産の健康食品・化粧品素材の探索として抗炎症活性についてスクリーニングを行った結果、カタクリ草の葉のメタノール抽出物に強い炎症性サイトカイン TNFα産生抑制作用を見出した。そのため、本研究では、カタクリ草葉抽出物が TNFα等の炎症性サイトカイン類の遺伝子発現に及ぼす影響について解析を行った。

【方法】

青森県内群生地で採取したカタクリ草の葉部の凍結乾燥物から 80%メタノールで抽出を行い、減圧濃縮後 DMSO に溶解して抽出物を調製した。マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に、リポ多糖 LPS（2ng/ml）とカタクリ草葉抽出物（75、150、300、600μg/ml の 4 濃度群）を共処理培養し、その細胞から total RNA を抽出して cDNA 合成後リアルタイム PCR 解析により、LPS 刺激によって誘導される TNFα及びその他の炎症性サイトカイン類の遺伝子発現量を調べた。

【結果】

LPS のみ処理群では、TNFα遺伝子からの mRNA 発現量が上昇しているが、それに対して各濃度のカタクリ草葉抽出物+LPS 処理群では、その mRNA 発現量上昇が濃度依存的に有意に抑制されていき、カタクリ草葉抽出物 300μg/ml 処理群では 1/20 にまで発現量が著しく減少することが明らかとなった。

また、他の炎症性サイトカイン類についても遺伝子発現解析を行った結果、IL1β及び IL6 遺伝子の mRNA 発現においても TNFαの場合と同様に、LPS 刺激による mRNA 発現量の上昇に対してカタクリ草葉抽出物+LPS 処理群で濃度依存的に有意な発現抑制が認められた。特に濃度 150μg/ml 処理群では、IL1β及び IL6 の mRNA 発現量がそれぞれ LPS のみ処理群 mRNA 発現量の 1/70、1/15 にまで減少した。

従って、カタクリ草葉抽出物は、TNFα に加えて IL1βや IL6 等の炎症性サイトカイン類の産生を遺伝子発現段階レベルで抑制することが確認され、その結果として抗炎症作用を示すことが示唆された。

Erythronium japonicum　Decne., anti-inflammatory, gene expression analysis

発表責任者：岩間直子（naoko_iwama@aomori-itc.or.jp）

講演番号：2B05p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B05 会場

マクロファージモデル細胞における IL-12 発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析

Search and Analysis for probiotics which could enhance IL-12 expression in macrophage-like cells

○梅谷 華奈[1]、本田 瑞希[2]、鈴木 政彦[3]、辻川 勇冶[3]、坂根 巌[3]、提坂 裕子[3]、萩原 彼方[1]、林 秀謙[1]、薩 秀夫[1]([1]前工大・工、[2]前工大院・工、[3](株)伊藤園・中央研究所)
○Kana UMETANI[1], Mizuki HONDA[2], Masahiko SUZUKI[3], Yuji TSUJIKAWA[3], Iwao SAKANE[3], Yuko SAGESAKA[3], Kanata HAGIWARA[1], Hidenori HAYASHI[1], Hideo SATSU[1] ([1]Maebashi institute of technology, [2]Dept. of biotech., Maebashi institute of technology, [3]ITO EN, LTD., Central Research Institute)

【目的】インターロイキン 12(IL-12)はマクロファージや樹状細胞から分泌されるサイトカインであり、免疫賦活作用が報告されている。すなわち分泌された IL-12 は、CD4T 細胞などからのインターフェロンγ（IFNγ）の産生を亢進し、IFNγはナチュラルキラー（NK）細胞を活性化することでウィルス感染細胞やがん細胞などに対する攻撃を増強し、生体防御能を高めることが知られる。一方乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスは近年様々な機能性が報告されており、NK 細胞の活性化などを介した感染防御能の亢進なども報告されている。そこで本研究では NK 細胞活性化を誘導する IL-12 に注目し、マクロファージモデル細胞を用いて IL-12 の発現・産生を亢進する新たなプロバイオティクスの探索・解析をおこなうこととした。
【方法】マクロファージモデル細胞として、マウス由来 J774.1 細胞を用いることとした。J774.1 細胞を 24 ウェルプレートに培養後、乳酸菌やビフィズス菌を含んだ培地で、37℃で 3 時間インキュベートした。インキュベート後 J774.1 細胞より RNA を回収して cDNA を合成、real-time PCR に供して IL-12 の mRNA 発現量を測定した。また培地中に分泌された IL-12 量は、sandwich-ELISA 法を用いて検討した。添加した乳酸菌・ビフィズス菌は死菌体を用いることとし、24 時間嫌気培養をおこなった後 PBS で２回洗浄した。その後 PBS に懸濁し、121℃、15 分間オートクレーブ処理したものを用いた。
【結果】数十種類の乳酸菌・ビフィズス菌を用いて、J774.1 細胞における IL-12 mRNA 発現量を亢進する乳酸菌の探索をおこなった。その結果、*Lactobacillus acidophilus* 科に属するある種の菌株が IL-12 の mRNA 発現量を顕著に増加させることを見出した。そこでこの菌株の菌数を変えて J774.1 細胞に添加したところ、添加した菌数依存的に IL-12 の mRNA 発現量は増加し、1×10^8 で最も高い mRNA 発現量の増加がみられた。またこの菌株を J774.1 に添加して 24 時間培養後の培地を sand-witch ELISA に供したところ、IL-12 分泌量の増加が確認された。以上より、*Lactobacillus acidophilus* 科に属するある種の菌株は IL-12 の発現を亢進することが示された。現在さらに、菌体のどのような成分が IL-12 誘導活性を有しているのか、菌体に DNase や RNase など各種酵素処理をおこなうことで解析を進めている。

IL-12, probiotics, macrophage

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2B05p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B05 会場

食品アレルギー誘導時に観察される肺組織における活性化 $CD4^+$ T 細胞と顆粒球の増加

Increased number of activated T cells and granulocytes in the lung during food allergy

○高橋 輝、津田 真人、細野 朗（日大生資科・食品生命）
○Akira TAKAHASHI, Masato TSUDA, Akira HOSONO (Nihon Univ.)

【目的】 食品アレルギーは小児期に好発し、喘息の悪化リスクを亢進することが示唆されている。しかし、抗原の経口摂取が肺組織の免疫応答へ与える影響については十分に明らかにされていない。そこで本研究では食物アレルギーモデルマウスを使用し、抗原の経口摂取を介して誘導された食品アレルギーが肺組織に与える影響について、特に抗原特異的な $CD4^+$ T 細胞の応答と、喘息における炎症反応を促進する働きを持つ顆粒球（特に好酸球と好塩基球）について解析した。
【方法】 食品アレルギーモデルマウスである卵白オボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス（OVA23-3 マウス）を 2 群に分け、一方には抗原となる卵白を含む 20%卵白含有飼料を、他方には対照としてカゼイン含有飼料を 1 週間自由摂取させた。このマウスから脾臓と肺を採取し、細胞調製を行った。細胞懸濁液を OVA 刺激条件下で 48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン産生量について ELISA 法を用いて測定した。また、調製した細胞中の活性化（$CD44^{high}$ $CD62L^{low}$）$CD4^+$ T 細胞と顆粒球（好酸球：$CD11c^-SiglecF^+$細胞、好塩基球：Fc ε RI^+ $CD49b^+$細胞）の割合および、細胞内サイトカインの発現についてフローサイトメトリーを用いて測定した。
【結果】 肺細胞の培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した結果、卵白含有飼料の摂取によって肺細胞による Th1 型サイトカイン（IFN-γ）の産生量が減少し、Th2 型サイトカイン（IL-4, IL-5, IL-13）の産生量が増加することが観察された。また、フローサイトメトリーによる解析の結果、卵白含有飼料の摂取によって、肺細胞中の活性化 $CD4^+$ T 細胞および、好酸球、好塩基球の割合が有意に増加していた。さらに、細胞内サイトカインの測定によって、卵白含有飼料を摂取により IL-4 を発現する肺細胞の増加が認められた。特に、IL-4 を発現する肺細胞の中では好塩基球が $CD4^+$ T 細胞より高い割合を占めていた。これらの結果から、食品アレルギーの誘導時では、肺において Th2 細胞の活性化に加えて、好酸球や好塩基球の増加が誘導されており、これらの細胞群が喘息などの炎症応答が誘導されやすい環境の形成に関与している可能性が推察された。

food allergy, lung, granulocytes

講演番号：2B05p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B05 会場

ナリンゲニンは TNF-α 抑制とバリア回復を介して腸管炎症を回復させる

Naringenin restores intestinal inflammation through TNF-α suppression and barrier recovery

○茶園 悠太、鈴木 卓弥 (広島大学)
○Yuta CHAEN, Takuya SUZUKI (Hiroshima Univ.)

【背景・目的】消化管の慢性炎症は、上皮バリアの損傷と炎症性サイトカインの過剰産生に特徴づけられ、これらは互いに影響し合いながら炎症状態を増悪させる。すなわち、上皮タイトジャンクション（TJ）構造の損傷は、炎症性異物の侵入を引き起こし、免疫細胞の過剰な活性化を誘導する一方で、腫瘍壊死因子(TNF)-α などの炎症性サイトカインは、TJ バリアを損傷することが知られている。これまでに私たちの研究グループでは、柑橘系ポリフェノールのナリンゲニンをマウスにあらかじめ摂取させると、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性の大腸炎の発症を抑制することを見出している。しかしながら、炎症状態の消化管に対するナリンゲニンによる影響は全く知られていない。炎症性腸疾患に代表される慢性炎症疾患は、再燃と寛解を繰り返すことも含め、炎症を予防するとともに、速やかに炎症からから回復させるが大切である。そこで本研究は、まず大腸炎を発症させたマウスにナリンゲニンを摂取させ、大腸炎回復効果を解析した。さらに、炎症状態にある結腸の組織培養法を用い、ナリンゲニンによる炎症回復メカニズムを探索した。
【方法・結果】マウスに DSS 誘導性の大腸炎を発症させた後、ナリンゲニンを 11 日間摂取させたところ(混餌として 0.3%)、血便・下痢・体重減少等の症状をより早く回復させる傾向を示した。このときナリンゲニン摂取は、結腸の TJ タンパク質発現量(Claudin-3、JAM-A）の上昇(Western Blot 法)と炎症性サイトカインの発現量(TNF-α、IFN-γ、IL-6)の抑制傾向を示した（qPCR 法)。続いて、炎症状態にある大腸組織をナリンゲニン存在下(~200 μM)で 24 時間培養し、TJ タンパク質と炎症性サイトカイン発現を解析した。この短期間の培養では、TJ タンパク質への影響は確認できなかったが、ナリンゲニンにより TNF-α の発現量(qPCR 法、ELISA 法）が抑制された。このとき、ナリンゲニンにより TNF-α 産生に関わる細胞内シグナル経路(NF-κB、Akt、ERK1/2)が抑制された(Western Blot 法)。さらに、TNF-α 産生抑制に関わる細胞群をフローサイトメトリー法により解析したところ、ナリンゲニンはマクロファージなどの免疫細胞ではなく、大腸上皮細胞における TNF-α を抑制していた。
【結論】ナリンゲニンの摂取は、大腸炎に対して予防的に作用するだけでなく、TJ バリア損傷と炎症性サイトカインの抑制を通して、大腸炎の回復を早めることが確認された。この初期段階のメカニズムとして、上皮細胞における炎症性シグナルと TNF-α 産生抑制が関わり、それに続いて TJ バリアの回復につながることが提案された。

Polyphenol, Tight junction, TNF-α

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B05p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B05 会場

FBP1 は２つの異なる作用を介して腸管上皮バリア機能の維持に関わる

FBP1 maintains the intestinal epithelial barrier function through two different mechanisms

○宮下 采佳、藤村 直人、小早川 哲朗、中田 一彰、中西 祐輔、花澤 重正、高橋 恭子（日大生物資源）
○Saika MIYASHITA, Naoto FUJIMURA, Tetsuro KOBAYAKAWA, Kazuaki NAKATA, Yusuke NAKANISHI, Shigemasa HANAZAWA, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

【目的】

α-ディフェンシン 5 は腸管上皮で産生される主要な抗菌ペプチドの１つである。特に、小腸クリプトのパネート細胞から多量に産生され、侵入してくる病原菌に対する感染防御に加え腸内細菌叢のバランスの維持に重要な役割を果たしている。さらに、クローン病でα-ディフェンシン 5 の発現低下が観察されるなど、その産生異常と炎症性腸疾患等の疾患との関わりが報告されている。したがって、α-ディフェンシン 5 の産生調節は、炎症性腸疾患等の予防や治療への応用が期待されるが、その機構は十分に明らかになっていない。

これまでにα-ディフェンシン 5 遺伝子の転写活性化領域として nt-653/-650(翻訳開始点を+1 とする)を同定し、この領域に結合する因子として FBP1 を同定した。本研究では、FBP1 がα-ディフェンシン 5 の発現誘導に加え、そのほかの腸管上皮機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 に FBP1 siRNA またはコントロール siRNA を導入し、24 時間培養後、細胞を回収して核画分と細胞質画分のライセートを調製した。FBP1 およびタイトジャンクション関連タンパク質である Occludin および Claudin-4 の発現をウエスタンブロッティングにより解析した。

【結果】

FBP1 は、定常状態の Caco-2 では主に核画分に存在した。Caco-2 に FBP1 siRNA を導入することにより、核内の FBP1 の発現が低下することが確認された。この時、FBP1 siRNA を導入した細胞は、コントロール siRNA を導入した細胞と比較して、Occludin と Claudin-4 の発現が低下することが明らかになった。したがって、FBP1 の発現低下により、上皮透過性が亢進する可能性が示された。

以上の結果から、FBP1 はα-ディフェンシン 5 の産生に加え、タイトジャンクションの形成を促進する機能を持つと予想され、腸管上皮バリア機能の維持に重要な役割を果たすことが考えられる。

α-defensin 5, FBP1, tight junction

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B05p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟南 B05 会場

腸管上皮透過性を亢進させる低分子量 GTP アーゼ ARF4 の発現分布と役割

Expression pattern and role of small GTPase ARF4 that increases intestinal epithelial permeability

○中田 一彰、村松 芳樹、杉 由高、楢林 ひかり、中西 祐輔、津田 真人、細野 朗、上野川 修一、花澤 重正、高橋 恭子（日本大学生物資源科学部）
○Kazuaki NAKATA, Yoshiki MURAMATSU, Yutaka SUGI, Hikari NARABAYASHI, Yusuke NAKANISHI, Masato TSUDA, Akira HOSONO, Shuichi KAMINOGAWA, Shigemasa HANAZAWA, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

[目的]

腸管の粘膜表面は上皮細胞で覆われており、隣り合う細胞間でタイトジャンクションを形成することにより上皮透過性を制御している。この機構により、外界からの食品をはじめとする抗原、または腸管に生息する腸内細菌が直接体内に侵入することを防いでいる。したがって、腸管の恒常性が維持されるためには上皮透過性の制御が不可欠である。一方で、腸内細菌叢の dysbiosis により腸管上皮透過性が亢進し、様々な疾患につながることが報告されている。

これまでに、腸内細菌による上皮透過性のコントロールに関わる分子として低分子量 GTP アーゼ ARF4 を同定した。また、この分子がタイトジャンクション関連タンパク質の発現を抑制して上皮透過性を亢進させることを明らかにした。そこで、腸管上皮における ARF4 の発現分布や役割を明らかにすることを目的とした。

[方法]

通常および無菌の雌性 BALB/c マウス (10-12 週齢) の小腸と大腸から腸管上皮細胞 (IEC) を調製し、ARF4 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。この時、小腸は 5 分割して胃側（近位）、中央（中位）、盲腸側（遠位） の 3 箇所を部位別に解析した。また、通常マウスの腸管各部位の組織より凍結切片を作製し、免疫蛍光染色により腸管における ARF4 の局在を解析した。さらに、3%DSS 水溶液をマウスに 5 日間自由摂取させた後、大腸より IEC を調製し、大腸炎誘導時における ARF4 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。

[結果]

マウス各腸管部位から IEC を調製し ARF4 の発現を解析した結果、近位小腸および大腸で発現が高く、遠位小腸で発現が低いことが明らかになった。さらに、小腸 IEC の ARF4 の発現は、腸内細菌の影響を顕著に受けないのに対し、大腸 IEC における発現は無菌マウスでは通常マウスに比べて有意に低く遠位小腸と同程度であった。したがって、大腸 IEC における ARF4 の発現が腸内細菌により誘導されることが示された。次に、免疫組織染色により各腸管部位の ARF4 の発現を解析した結果、全ての部位で上皮細胞に発現していることが確認された。また、マウスに DSS を投与することにより、未投与群と比較して大腸 IEC における ARF4 の発現が上昇することが示された。以上の結果から、大腸 IEC に発現する ARF4 は、腸内細菌叢の乱れに起因する腸管炎症に関与する可能性が示唆された。

intestinal epithelial cell, small GTPase, microbiota

講演番号：2B05p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B05 会場

Down-regulation of *Cd14* expression in liver by ingestion of megalo-type isomaltosaccharides might be prerequisite for amelioration of LPS-induced liver injury in rats

○Ga Hyun Joe[1], Takahisa Iizuka[2], Yoshinori Fujimoto[2], Atsuo Kimura[1], Hiroshi Hara[1], Satoshi Ishizuka[1] ([1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan, [2]Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., Shizuoka, Japan)

Background: Megalo-type isomaltosaccharides (M-IMs) are composed of 10 to 50 monosaccharide units, whereas "oligosaccharides" represents carbohydrate less than 10 monosaccharide units. IMs are one of the slowly-digestible saccharides, and they primarily consist of α-1,6-glucosidic linkages. M-IMs display delayed absorption and may stay relatively long time in the gastrointestinal tract, which enables them to encounter host immune cells. It is possible that M-IMs regulate functions of innate immunity. We investigated whether a long-term ingestion of the M-IM influence acute liver inflammation.

Methods: Male F344/Jcl rats (5 weeks old) were fed diet supplemented with or without M-IMs (30 g/kg diet) for 35 days. At the end of the experimental period, the rats were administrated with 4 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 055:B5) to induce acute liver injury. At 6 hours after the LPS administration, the aorta plasma was collected to measure alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activities as well as factors related with acute inflammation such as interleukin (IL) 6, caspase-1, and IL1β. In a separate experiment, rats were fed diets supplemented with or without M-IMs for 37 days. The liver was collected to analyze gene expressions associated with immune functions with RT-qPCR.

Results: Plasma AST and ALT activities were attenuated accompanied by reduced plasma IL1β concentration in the rats fed M-IMs in response to LPS. Plasma IL6 concentration tended to decrease in the rats fed the M-IM diet. There was no significant difference in the inflammation related cytokine expressions in the liver between the groups. In the rats without LPS injection, hepatic expression of *Cd14*, known as a LPS receptor, decreased significantly in the M-IM-fed rats. These results suggest that long-term ingestion of the M-IMs suppresses acute liver inflammation via alteration of gene expressions associated with induction of inflammation.

Innate immune system, Acute inflammation, Megalo-type isomaltosaccharides

発表責任者：石塚敏（zuka@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B05p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B05 会場

マクロファージ炎症応答に対するライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol の抗炎症作用
Anti-inflammatory effect of Oligonol, oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit polyphenol, on inflammatory response in macrophages
○河合 咲紀[1]、上原 華[1]、佐藤 道夫[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2]([1]明治大・農・農化、[2]（株）アミノアップ化学)
○Saki KAWAI[1], Hana UEHARA[1], Michio SATO[1], Kyochi OSADA[1], Jun TAKANARI[2], Kentaro KITADATE[2] ([1]Meiji Univ., [2]Amino Up Chemical Co., Ltd.)

【目的】 マクロファージや単球をはじめとした免疫担当細胞の脂肪組織への浸潤がメタボリックシンドロームの発症と進展に深く関与しており、脂肪細胞の慢性炎症を抑制することがメタボリックシンドロームの予防及び改善に重要である。Oligonol はライチ由来ポリフェノールを酸熱分解することで低分子化し、生体への吸収率を高めたプロシアニジンリッチなポリフェノール素材である。我々は、これまでに、ラットへの Oligonol 投与による生体内コレステロール低下作用や抗動脈硬化作用を報告してきた。Oligonol の投与により、リン脂質膜中の脂肪酸組成に変化が生じ、抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。また、マクロファージは活性化によって形態が大きく変化することが報告されている。そこで、本研究では、LPS によって炎症を誘導したマクロファージ細胞に対する Oligonol の抗炎症作用について、形態学的観点から検討した。
【方法】 マウス由来マクロファージ様株化細胞 J774A.1 を、24 時間 LPS(1μg/mL)で暴露して炎症を誘導した。炎症誘導時、誘導前あるいは誘導後にそれぞれ Oligonol(10～100μg/mL)に暴露し、培養液中 NO レベルを測定することで、Oligonol の抗炎症作用、炎症改善作用あるいは炎症予防作用の有無について検証した。また、SEM を用いて培養後の細胞表面を観察した。
【結果と考察】 LPS 暴露によって培養液中の NO レベルは有意に高くなり、炎症が誘導されていることを確認した。抗炎症あるいは炎症改善モデルにおいては、培養液中の NO レベルは高レベル Oligonol 暴露群では LPS 単独暴露群と比べて有意に低くなったが、低レベル Oligonol 暴露群では高くなった。炎症予防モデルにおいては、Oligonol の暴露濃度依存的に培地中の NO レベルは低くなった。また、マクロファージの形態学的変化を観察し、球状の A、ラッフルが 1 方向に伸びている B、円盤状に広がっている C、さらに平面上に広がり核と細胞質の境界の判別がつかないものを D と形態ごとにマクロファージを分類した。その結果、LPS 暴露によって、活性型の B, C, D 型の割合が 60%以上を占めるのに対し、Oligonol で暴露することによって 20%以下まで低くなった。以上の結果から、細胞表面上に Oligonol が付着、あるいは貪食されることによって、炎症誘導が阻害された可能性が考えられた。しかし、炎症発症時や低用量の Oligonol 摂取時にはむしろ炎症促進的に働く可能性も考えられ、摂取量や摂取するタイミングについては注意が必要ではないかと思われた。

anti-inflammation, Oligonol, macrophage

講演番号：2B05p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B05 会場

腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成抑制機構
Mechanisms underlying the suppression of granule formation by intestinal bacteria
○池谷 彩花[1]、雑賀 有香[1]、笠倉 和巳[1,2]、堀 大峰[1]、中西 祐輔[1]、花澤 重正[1]、高橋 恭子[1] ([1]日大生資、[2]東京理科大基礎工)
○ Ayaka IKETANI[1], Akari SAIKA[1], Kazumi KASAKURA[1,2], Hirotaka HORI[1], Yusuke NAKANISHI[1], Shigemasa HANAZAWA[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Tokyo Univ. Sci)

【背景・目的】
近年、腸内細菌の抗アレルギー作用が注目されている。I型アレルギーにおいては、マスト細胞が IgE とアレルゲンに刺激されることにより、細胞内の顆粒に含まれるヒスタミンが放出されアレルギー炎症が誘導される。本研究では、腸内細菌の抗アレルギー作用の新規なメカニズムを明らかにすることを目的とし、マスト細胞に対する作用に着目した。これまでに、免疫細胞の分化や運命決定に関与する転写因子 C/EBPα がマスト細胞の顆粒形成を抑制すること、*Lactobacillus casei* JCM[1134] 菌体がマスト細胞における C/EBPα の発現を上昇させることを報告している。本研究では、C/EBPαによる顆粒形成の抑制機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】
6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスから大腿骨および下腿骨を採取して骨髄細胞を調製し、IL-3 存在下で 4-8 週間培養して骨髄由来マスト細胞（BMMC）を得た。BMMC を *L. casei* JCM[1134] 株の超音波破砕菌体にて 1μg/ml の濃度で 2 日ごとに刺激を繰り返した。対照として BMMC に菌体を添加せずに同様の処理を行った。細胞を 7 日ごとに回収し、総 RNA を調製後、逆転写、定量 PCR を行い、顆粒形成にかかわる各分子(histidine decarboxylase (HDC), serglycin, mast cell protease 4,5,6 (Mcpt4,5,6), chondroitin 4-sulphotransferase-1 (C4ST-1), N-deacetylase/N-sulfotransferase2 (NDST2), carboxypeptidase A3(Cpa3), Cu トランスポーター(Ctr2), N-acetylgalactosamine(4S)-6-O-sulfotransferase (GalNAc4S6ST))の発現量を解析した。それぞれの発現量は GAPDH の発現量で補正を行った。また、BMMC にエレクトロポレーションにより C/EBPα発現プラスミドまたは対照として空ベクターを導入して 24 時間培養後、細胞を回収した。同様に、総 RNA を調製後、逆転写、定量 PCR を行い各分子の発現量を解析した。
【結果】
HDC, Serglycin, Ctr2, Mcpt4 の発現量は *L.casei* 菌体の添加により減少することが確認された。また、このうち、Serglycin, Mcpt4 は C/EBPα の強制発現により発現抑制がみられたことから、これらの分子の発現の変化は C/EBPα 依存的な変化であることが示された。一方、HDC, Ctr2 の発現は、C/EBPα の強制発現により抑制されず、C/EBPαに非依存的な変化であることが明らかになった。したがって、腸内細菌による顆粒形成の抑制は、C/EBPαに依存的に Serglycin や Mcpt の発現が抑制されることによると考えられた。

mast cell, granule, C/EBPα

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B05p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B05 会場

腸管粘膜マスト細胞の特徴
Characteristics of intestinal mucosal mast cells
○堀 大峰、石川 裕子、池谷 彩花、中西 祐輔、花澤 重正、高橋 恭子（日本大学生物資源科学部）
○ Hirotaka HORI, Yuko ISHIKAWA, Ayaka IKETANI, Yusuke NAKANISHI, Shigemasa HANAZAWA, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ. College of Bioresource Sciences)

[背景・目的]
マスト細胞の本来の生理的役割は寄生虫感染等に対する防御応答であるとされるが、宿主の免疫バランス異常により無害な抗原に対してアレルギーと呼ばれる過剰な炎症反応を誘導する。食物アレルギーなどに代表される I 型アレルギーにおいては、マスト細胞表面上の高親和性 IgE 受容体(FcεRI)が IgE と抗原により架橋されることで、ヒスタミン等の化学伝達物質が放出される。近年、炎症性腸疾患においても腸管マスト細胞の関与が報告されている。マスト細胞は、骨髄中で造血幹細胞から分化して血液中に放出され、到達した末梢組織で最終分化・成熟を遂げることから、各末梢組織の環境により特徴的な性質を獲得する。腸管粘膜のマスト細胞は食品成分や腸内細菌等が存在する複雑な腸管環境の影響を受けると考えられるが、その詳細は未だ明らかとされていない。そこで本研究では小腸の粘膜固有層(LP)からマスト細胞を単離し、その特徴を明らかにすることを目的とした。
[方法]
雌性 BALB/c マウス(8-10 週齢)から小腸を採取し、コラゲナーゼ処理により LP 細胞を調製した後、Percoll を用いた密度勾配遠心法により 40%(上層)/80%(下層)の境界面から細胞を回収した。その後、セルソーターを用いて $CD45^{+}CD3\varepsilon^{-}CD19^{-}NK1.1^{-}Ter\text{-}119^{-}Fc\varepsilon RI\alpha^{+}c\text{-}kit^{+}$細胞としてマスト細胞を分取した。また、比較対象として雌性の BALB/c マウス(6 週齢)の大腿骨および下腿骨から骨髄細胞を調製し、IL-3 存在下で 4-9 週間培養して骨髄由来マスト細胞(BMMC)を得た。これらの細胞からそれぞれ総 RNA を調製・逆転写し、FcεRIα 鎖・β 鎖及びマスト細胞の細胞内顆粒に特徴的に含まれるプロテアーゼ(Mcpt)の発現を 定量 PCR によって解析した。
[結果]
小腸 LP のマスト細胞における FcεRI の発現を確認したところ、対照として分取した $Fc\varepsilon RI\alpha^{-}c\text{-}kit^{-}$集団において α 鎖および β 鎖のいずれの発現も検出されなかったのに対し、両サブユニットの発現が確認された。さらに、LP 由来のマスト細胞においては、FcεRIα 鎖と β 鎖の発現が BMMC と比べてそれぞれおよそ 1/4、およそ 1/3 と低いレベルであった。また、Mcpt の発現が、LP 由来のマスト細胞では BMMC と比べて著しく高いことが示された。以上の結果より、小腸 LP マスト細胞は、末梢組織での最終分化、成熟過程で腸管特有の環境に影響を受けることで、特徴的な表現型および機能を有することが示唆された。現在、その他の分子の発現パターンについても解析中である。

Mast cell, Small intestine, Lamina propria

発表責任者：高橋 恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B05p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B05 会場

酵素合成グリコーゲンは RBL-2H3 細胞における脱顆粒および炎症性サイトカインの産生を抑制する
Enzymatically synthesized glycogen prevents degranulation and inflammatory cytokines production in RBL-2H3 cells

○吉岡 泰淳[1]、井上 雅子[2]、古屋敷 隆[3]、芦田 均[4] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]神戸大・農、[3]江崎グリコ（株)、[4]神戸大院・農)
○Yasukiyo YOSHIOKA[1], Masako INOUE[2], Takashi FURUYASHIKI[3], Hitoshi ASHIDA[4] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Dep. Agri., Kobe Univ., [3]Ezaki Glico Co. Ltd., [4]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.)

【目的】
酵素合成グリコーゲン（ESG）は、食物繊維様作用や大腸炎の予防、皮膚への UV ダメージを抑制することが報告されている。われわれは、ESG が、腸管細胞 Caco-2 細胞とラット好塩基球系細胞 RBL-2H3 細胞の共培養系において、脱顆粒を抑制することを明らかにしてきた。そこで本研究では、ESG の Caco-2 細胞と好塩基球系 RBL-2H3 細胞の共培養系における脱顆粒および炎症性サイトカイン産生抑制機構の解明とマウスを用いた受動皮膚アナフィラキシー（PCA）反応に対する効果を検討することとした。
【方法】
RBL-2H3 細胞に Monoclonal anti-dinitrophenyl (DNP) IgE 抗体を 16 時間感作させた。ESG を 15 分間処理し、抗原として DNP-bovine serum albumin (DNP- BSA) で 1 時間刺激した。それらの培養上清に含まれるヒスタミンの指標である β-hexosaminidase 量を比色法にて測定した。また、ESG を 24 時間処理し、抗体抗原反応を誘導し、β-hexosaminidase 放出量および炎症性サイトカイン産生量を測定した。さらに、トランズウェルを用いて、Caco-2 細胞と RBL-2H3 細胞の共培養系を構築した。ウェスタンブロット法にて、抗原抗体反応下流のシグナル因子の発現および活性化について定量した。最後に、BALB/c マウスを用いた PCA 反応に対する ESG の影響を検討した。
【結果】
ESG の 24 時間処理は、RBL-2H3 細胞における抗原抗体反応を介した β-hexosaminidase 放出および炎症性サイトカインである TNF-α および IL-6 の発現を有意に抑制した。しかしながら、ESG の 15 分間処理では抑制効果はみられなかった。ESG は、トランズウェルを用いた共培養系において、RBL-2H3 細胞からの β-hexosaminidase 放出、TNF-α 並びに IL-6 の産生を抑制した。また、ESG は、RBL-2H3 細胞において、チロシンキナーゼの Lyn および Syk のリン酸化を抑制した。ESG は、BALB/c マウスにおける PCA 反応においても抑制を示した。
【結論】
ESG は、腸管から体内へ吸収されることはないことから、腸管細胞への刺激を介して、I 型アレルギーを抑制することが示唆された。現在は、ESG の BALB/c マウスにおける I 型アレルギーの抑制機構について詳細な検討を行っている。

glycogen, RBL-2H3 cells, Caco-2 cells

講演番号：2B05p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟南 B05 会場

シトラスおよびオレンジペクチンの給餌が実験的大腸炎保護効果に及ぼす影響の比較解析

Comparison of protective effect of citrus and orange pectin on experimental colitis

○真野 敏行[1]、石其 慧太[2]、北口 公司[3]、矢部 富雄[3,4] ([1]岐阜大院・自然科技、[2]岐阜大院・連合農学、[3]岐阜大・応用生物、[4]生命の鎖統合研究センター)
○Toshiyuki MANO[1], Keita ISHISONO[2], Kohji KITAGUCHI[3], Tomio YABE[3,4] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., [2]Gifu Univ., Unit. Grad. Sch. Agri. Sci., [3]Gifu Univ., Dept. Apl. Life Sci., [4]G-CHAIN)

【目的】　水溶性食物繊維のペクチンは，ガラクツロン酸が α-1,4 結合した主鎖にガラクトースやアラビノース等の中性糖から構成される側鎖が付加した複合多糖類の一種である。側鎖構造は由来する植物種によって異なっている。我々はこれまでに，マクロファージの自然免疫応答の制御にペクチンの側鎖構造が重要であることを *in vitro* の実験系において明らかにしてきた。しかしながら，*in vivo* における側鎖構造と生体調節機能との関連には不明な点が多い。実験的大腸炎モデルにおいてペクチンの給餌が保護効果を示すことが報告されているため，本研究では，ペクチンの側鎖構造の差異が大腸炎モデル病態に与える影響を評価した。

【方法】　7 週齢の C57BL/6 マウスに対照飼料(AIN-93G)，5%シトラスペクチン含有飼料および 5%オレンジペクチン含有飼料を給餌した。給餌開始から 10 日目に 3% Dextran sulfate sodium (DSS)水溶液を飲水投与することで大腸炎を誘導し，経時的に体重変化や糞便の状態を観察した。解剖の際には，採取した大腸の長さを測定し，その一部から組織溶解液を作成した。調製した組織溶解液を用いて，大腸における炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

【結果と考察】　DSS 投与開始後の体重変化の割合は，対照飼料摂取群では 5 日目以降に体重減少が観察され，シトラスペクチン含有飼料摂取群においても同程度であった。一方で，オレンジペクチン含有飼料摂取群においては大腸炎による体重減少が緩和されていた。また，糞便状態から求めた Clinical score や大腸の萎縮についても，対照飼料摂取群やシトラスペクチン含有飼料摂取群と比較して，オレンジペクチン含有飼料摂取群において軽減されていた。大腸における炎症性サイトカインについても，対照飼料摂取群やシトラスペクチン含有飼料摂取群と比較して，オレンジペクチン含有飼料摂取群において Interleukin(IL)-1β 濃度の上昇が抑制されていた。

以上の結果より，由来植物種が異なるペクチンでは大腸炎に対する保護効果の程度に差異があり，シトラスペクチンと比較して，オレンジペクチンはより高い大腸炎保護効果を示すことが認められた。これまでの研究では，オレンジペクチンにはシトラスペクチンよりも側鎖を構成するガラクトース残基やアラビノース残基が多く含まれていることが報告されている。したがって，オレンジペクチン中の側鎖構造が大腸炎保護効果に影響を与えている可能性が示唆された。

anti-inflammation, colitis, pectin

講演番号：2B05p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟南 B05 会場

インドールピルビン酸のマウス大腸炎症の抑制機構の検討

Protective effect of Indole-3-pyruvic acid against experimental colitis

○青木 玲二[1]、青木 綾子[2]、鈴木 チセ[1]、高山 喜晴[1] ([1]農研機構畜産研、[2]東大院農生科)
○Reiji AOKI[1], Ayako AOKI[2], Chise SUZUKI[1], Yoshiharu TAKAYAMA[1] ([1]NARO, [2]UTokyo)

【背景・目的】

我々はこれまでに、トリプトファン代謝物であるインドールピルビン酸に、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性の大腸炎症を抑制する作用があることを見出している（日本畜産学会第 122 回大会)。本研究では、インドールピルビン酸の大腸炎症抑制機構を調べるため、重症複合免疫不全（SCID）マウスに naïve T 細胞を移入することで誘導される大腸炎症モデルを用い、インドールピルビン酸の投与が炎症に与える影響を調べるとともに、大腸の遺伝子発現や大腸粘膜固有層（LPL）の CD4T 細胞に与える影響について調べた。

【方法】

Balb/c マウスの脾臓より naïve T 細胞を調製し、SCID マウスに移入後、インドールピルビン酸を 0.1%含有する MF 食を自由摂取させた。毎週体重を測定し、5 週後に糞便の下痢スコアを評価した。マウスは解剖後、大腸組織のヘマトキシリン・エオシン染色切片を作製し、炎症スコアを評価するとともに、大腸の遺伝子発現を解析した。さらに、大腸粘膜固有層リンパ（LPL）を回収し、T 細胞のサブセットを細胞内サイトカイン法により、フローサイトメトリーで解析した。

【結果】

SCID マウスは naïve T 細胞の移入により、体重が減少し、下痢症状が誘導され、大腸組織切片の炎症スコアが悪化した。インドールピルビン酸の投与は体重の減少を抑え、下痢症状、炎症スコアを有意に改善した。さらに、インドールピルビン酸の投与は、炎症性のサイトカインである Interleukin (IL)-1β、Th1 関連のサイトカインである IL-12p40、Interferon (IFN)-γ、Tumor necrosis factor-αの遺伝子発現を有意に抑制し､抗炎症性のサイトカインである IL-10 の遺伝子発現を有意に高めた。大腸 LPL の CD4T 細胞の細胞内サイトカインを解析した結果、インドールピルビン酸の投与は IFN-γ陽性 IL-10 陰性 CD4T 細胞を減少させ、逆に IFN-γ陰性 IL-10 陽性 T 細胞を増加させることが明らかになった。以上から、インドールピルビン酸は大腸 LPL において Th1 細胞を抑制し、IL-10 産生 CD4T 細胞を増加させ、大腸炎症を抑制することが示された。

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の戦略的イノベーション創造プログラム「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

indole-3-pyruvic acid, colitis, anti-inflammatory

講演番号：2B06a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B06 会場

培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるイソラムネチンの抗高尿酸血症作用の検討

Anti-hyperuricemic effect of isorhamnetin in cultured hepatocytes and model mice

○安達 真一[1]、高見 有希[2]、近藤 真司[1]、佐藤 祐介[3]、吉澤 史昭[3]、矢ヶ崎 一三[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]宇都宮大院・農、[3]宇都宮大・学術院)
○SHIN-ICHI ADACHI[1], YUKI TAKAMI[2], SHINJI KONDOU[1], YUSUKE SATO[3], FUMIAKI YOSHIZAWA[3], KAZUMI YAGASAKI[1] ([1]Utsunomiya Univ. C-Bio, [2]Graduate School of Agriculture, Utsunomiya Univ., [3]Utsunomiya Univ. Academic Association)

【目的】高尿酸血症は、血中の尿酸濃度が高まった状態であり、痛風の主な原因として知られている。近年、日本において高尿酸血症患者や痛風患者が増加していることから、尿酸値の上昇を抑制する天然物・食品由来有用成分の発掘が期待されている。高尿酸血症の原因のひとつに、尿酸の前駆体であるプリン体を多く含む食品の過剰摂取が挙げられる。プリン体は、肝臓においてキサンチンオキシダーゼなどの数種類の酵素により尿酸に代謝される。イソラムネチンは、メチル化フラボノールに分類されるポリフェノールであり、ナッツおよびワインに含まれていることが知られている。またイソラムネチンは、タマネギやイチゴに含まれるケルセチンの生体内代謝物のひとつである。イソラムネチンは抗酸化作用、抗炎症作用や抗がん作用などを示すことが報告されている。本研究では、高尿酸血症の予防・改善におけるイソラムネチンの有用性について明らかとするために、培養肝細胞におけるイソラムネチンの尿酸産生抑制作用の有無とプリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスにおけるイソラムネチンの尿酸値低下作用の有無について検討することを目的とする。
【方法】モデル肝細胞としてマウス由来 AML12 細胞を用いた。培養 AML12 細胞に尿酸前駆体であるグアノシンおよびイノシンとイソラムネチンを同時に作用させ、AML12 細胞の尿酸産生量を測定した。尿酸産生抑制剤であるアロプリノール、および AML12 細胞において尿酸産生を抑制することを既に確認しているケルセチン (Adachi *et al*., *Cytotechnology*, 2017, 69, 435-442)を陽性対照として細胞実験を行った。次に、高尿酸血症モデルマウスを用いて、イソラムネチンの経口投与が血漿尿酸濃度を低下させるかどうかを検討した。細胞実験に順じモデルマウスにアロプリノールおよびケルセチンを陽性対照として経口投与した。
【結果と考察】培養肝細胞を用いた検討では、ケルセチンおよびアロプリノールと同様に、イソラムネチンの添加により尿酸の産生が濃度依存的に有意に抑制された。また高尿酸血症モデルマウスの血漿尿酸濃度も、ケルセチンおよびアロプリノールと同様にイソラムネチンの経口投与により有意に低下した。以上の結果より、イソラムネチンは、抗高尿酸血症作用を有することが示唆された。その作用機構の一つとして、イソラムネチンが肝臓での尿酸産生を抑制するためであると考えられる。タマリキセチンやラムネチンなど他のメチル化ケルセチンの尿酸産生抑制作用および高尿酸血症モデルマウスにおけるイソラムネチンの作用機構についても報告する予定である。

hepatocytes, hyperuricemia, isorhamnetin

講演番号：2B06a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B06 会場

アブラナ科伝統野菜スプラウトの ACE 阻害物質の探索

Studies on ACE inhibitor of Brassicaceous traditional vegetable sprouts

○根古谷 竜、下村 講一郎（東洋大院生命）
○RYO NEGOYA, KOICHIRO SHIMOMURA (Grad. Sch. Toyo Univ.)

【緒言】
アブラナ科ツケナ類に属するナカジマナ(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*)は、石川県七尾市中島町で古くから栽培されている伝統野菜である。これまでにナカジマナのスプラウトは、栽培したものより ACE 阻害活性がより高くなることを見出している。ナカジマナ同様に、他のアブラナ科野菜にも ACE 阻害活性を示すものが報告されている。そこで本研究では、7 種類のアブラナ科伝統野菜スプラウトについて ACE 阻害活性の有無を調査するとともに、その ACE 阻害物質の探索を行った。

【材料および方法】
(材料) ナカジマナは「JA 能登わかば」より、その他は（株）トーホクより種子を分与いただいた。
(スプラウトの作製)種子 0.3g を 75% EtOH で 10 秒間殺菌し、滅菌水で 1 回洗浄した。その後、2% NaClO で 10 分間殺菌し、クリーンベンチ内にて滅菌水で 3 回洗浄した。滅菌済みプラントボックス（支持体：キムタオル）に殺菌した超純水を約 15mL 添加し、播種した。暗所（25℃）にて 11 日間栽培した。
(抽出・精製・分画) 凍結乾燥したサンプル約 1.0g に超純水 200mL を加え、100℃で 30 分間熱水抽出を行った。抽出液を 10KDa、3KDa で限外ろ過し、得られた抽出液を Sep-Pak Vac C18 カートリッジで 0.01% TFA を含有する H_2O、20%、40%、60%MeOH で順次溶出した。
(ACE 阻害活性) 上記の各分画について、ACE-Kit WST(Dojindo Inc.)を用い、IC_{50}を算出した。

【結果および考察】
分画したナカジマナの ACE 阻害活性は、H_2O＞60%MeOH＞20% MeOH＞40% MeOH の順に高い値であった。このことより、ACE 阻害活性を示す成分は複数あることが示唆された。MALDI-TOFMS で分析したところ、各 MeOH 濃度の溶出フラクションでは複数のピークを確認できた。H_2O フラクションでは明瞭なピークが検出できなかったので、現在分析条件を検討している。また、各 MeOH フラクションで検出されたピークについては、ニコチアナミンなど既知の ACE 阻害物質の可能性も考えられ、確認を行っている。他の 6 種類の伝統野菜などのスプラウトについても、ACE 阻害活性と Sep-Pak カートリッジにより分画した活性の違いについても併せて報告する。

Brassicaceae, ACE inhibition

講演番号：2B06a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B06 会場

チオレドキシン-1 高含有食による糖尿病モデルマウス血糖コントロールの改善

Improvement of blood glucose control in diabetic mice with a thioredoxin-1-rich diet

○渡邉 理江[1,2,3]、蘆田 弘樹[3]、増谷 弘[2]、三浦 美樹子[2,4]、横田 明穂[3]、淀井 淳司[2,5]([1]美作大学食物、[2]京都大学ウ研、[3]奈良先端科学技術大院バイオ、[4]島根大医、[5]Ewha 女大細胞シグナル)
○Rie WATANABE[1,2,3], Hiroki ASHIDA[3], Hiroshi MASUTANI[2], Mikiko KOBAYASHI-MIURA[2,4], Akiho YOKOTA[3], Junji YODOI[2,5] ([1]Mimasaka Univ., [2]Kyoto Univ., [3]NAIST., [4]Shimane Univ., [5]Ewha Womans Univ.)

【背景・目的】酸化ストレスとは、活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）が産生され障害作用を発現する生体応答とその活性酸素種の消去や障害修復の生体内防御機構との間で均衡が崩れた状態のことである。過剰に発生した活性酸素種により種々の臓器機能障害が惹起され、多くの疾患発症や進展・老化などの一因へと繋がる。酸化ストレスが関与する病態・症状として、糖尿病・アテローム動脈硬化症・パーキンソン病・心筋梗塞・アルツハイマー病・癌・脳梗塞・胃潰瘍・老化・喫煙障害など多くが知られている。この過剰な活性酸素種を体内消去するには、多くの活性酸素消去酵素や抗酸化剤のような低分子抗酸化物が関与することが明らかとなってきている。体内で生合成される抗酸化剤に加え、私たちが日常摂取している食品中にも抗酸化剤を含むものは数多くあり、食事からも抗酸化剤は補われている。すなわち，食生活習慣のあり方は酸化ストレスを考える上で重要なテーマの一つとなっている。酸化還元電位が非常に低いチオレドキシン-1 は、全ての生物に存在する抗炎症作用・抗酸化ストレス作用を持つ低分子抗酸化物であり、多くの疾患モデルマウス（免疫性疾患・糖尿病・消化管疾患・肺疾患・脳梗塞）で血中長期投与・遺伝子改変によりその病態の改善傾向が示されている。しかしながら、経口摂取による食事由来のチオレドキシン-1 の効果に関する知見は乏しくほとんど不明なままである。本研究では、糖尿病状態でのチオレドキシン-1 高含有食の影響を消化器系組織において検証した。
【方法・結果】糖尿病モデルマウス（Akita マウス）を用い、先に報告しているチオレドキシン-1 高発現レタスを含有する食餌にて長期負荷試験を行った。市販レタスを用いたコントロール食に比し、チオレドキシン-1 高発現レタス含有食では体重・飲水量・血糖値（グルコース負荷試験値）には影響がなかった。しかしながら、HbA1c 値は有意に低下した。加え、遺伝子組み換えコントロール食として GFP 高発現レタスを用いた食餌負荷実験も行ったが、チオレドキシン-1 高発現レタス食のみにて HbA1c 値が有意に低下した。そこで免疫組織化学染色法にて消化器系組織の影響を検討した。膵ラ氏島には組織学的な変化は認められなかったものの、腸管組織にてその変化を認めた。これらのことから、糖尿病状態におけるチオレドキシン-1 による腸管細胞を介した血糖コントロール改善効果の可能性が示唆された。

human thioredoxin-1

講演番号：2B06a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B06 会場

生理活性希少糖 D-アルロースの作用メカニズム： 線虫における細胞内エネルギーレベルへの影響

Mechanism of action of the bioactive rare sugar D-allulose: effects on the intracellular energy levels in *C. elegans*

○石井 綾佳[1]、太田 侑里[1]、新谷 知也[2]、佐藤 正資[1]([1]香川大農、[2]愛媛大院連合農)
○Ayaka ISHII[1], Yuri OTA[1], Tomoya SHINTANI[2], Masashi SATO[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Ehime Univ.)

【目的】希少糖とは，自然界に存在量の少ない単糖及びそれらの誘導体と定義される。このうち D-フラクトースの C3 エピマーである D-アルロース（D-プシコース）は血糖上昇抑制，抗肥満などの健康効果をもつことが報告されている。また，演者らは高濃度の D-アルロースは線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長を抑制し，低濃度ではその寿命を延長することを報告している。しかし，これらの D-アルロース生理活性の作用メカニズムは明らかではない。我々は，D-アルロースが線虫の体内に取り込まれ糖代謝を阻害することで，細胞内エネルギーレベルを低下させていると推定した。そこで本研究ではこの推定を検証するため,D-アルロース処理線虫,対照線虫における ATP,ADP,AMP 量を測定し，そこから求めた細胞内エネルギーレベルの比較をおこなった。
【方法】線虫の培養は常法に従い，餌である大腸菌を含む液体培地（S medium）中でおこなった。成長ステージによる D-アルロースの影響を比較するため，実験には初齢幼虫（L1）と終齢幼虫（L4）を用いた。L1,L4 幼虫をそれぞれ，D-プシコース(25, 50 mM) を含む液体培地で 2 日間培養し D-プシコース処理線虫を得た。D-プシコースを含まない培地で培養した線虫を陰性対照とした。 線虫に対して成長阻害を示す解糖系阻害剤 2-デオキシ-D-グルコース（2-DG；1.25，2.5 mM）処理線虫を陽性対照とした。これらの線虫を緩衝液中で 100℃，15 分間加熱し，抽出を行なった。得られた抽出液をクロロアセトアルデヒドで処理し，含まれるアデニン化合物を蛍光誘導体(1,N^6-etheno 化合物)とした後，HPLC で分析をおこない ATP,ADP,AMP を定量した。細胞内エネルギーレベルの評価はエネルギー充足率（Energy Charge（EC）＝[ATP]+0.5[ADP]/[ATP]+[ADP]+[AMP]）でおこなった。
【結果・考察】L1 処理において，陽性対照である 2-DG 処理線虫に顕著な EC の低下が認められた。しかし， D-アルロース処理線虫では，はっきりとした EC の低下は認められなかった。このことから，2-DG と D-アルロースは生理活性発現のメカニズムが異なることが示唆された。L4 処理においては，2-DG，D-アルロースともに EC の低下効果は認められなかった。これは，L4 はすでに体内に豊富な脂肪を蓄えており,糖代謝を阻害しても脂肪を分解することにより EC を維持できるためと考えられた。
　また，現在，D-アルロースが線虫体内に取り込まれているかについて検証しており，この結果についても報告する。

D-allulose, rare sugar, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B06a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B06 会場

希少糖 D-アルロースは食餌制限メカニズムによって線虫寿命を延長する

D-Allulose extends *Caenorhabditis elegans* lifespan through a dietary restriction mechanism

○佐藤 正資[1]、新谷 知也[2]、砂古口 博文[1]、吉原 明秀[3]、何森 健[3] ([1]香川大農、[2]松谷化学工業、[3]香川大国際希少糖研究教育機構)
○Masashi SATO[1], Tomoya SHINTANI[2], Hirofumi SAKOGUCHI[1], Akihide YOSHIHARA[3], Ken IZUMORI[3] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Matsutani Chem. Ind., [3]Int. Inst. of Rare Sugar Res. and Edu., Kagawa Univ.)

【目的】食餌制限（Dietary restriction, DR）によって，線虫，ショウジョウバエ，マウス，アカゲサルなど多くの実験動物の寿命が延長することが知られている。ヒトにおいても，DR は加齢性疾患の発症を遅らせ，寿命を延ばすと考えられている。しかし，生涯にわたって DR 食を続けるのは困難であり，摂取することにより DR と同等の効果を得ることができる食事制限模倣物質（DR mimetic）の開発が注目されている。我々はノンカロリー甘味料である希少糖 D-アルロース(D-Alu) が DR mimetic として働き，寿命延長効果があるのではないかと考えた。そこで，線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究をおこない，D-Alu が線虫寿命を延長することを報告している。今回，各種変異体に対する試験結果などから，その寿命延長メカニズムが DR 効果に基づくという知見を得たので報告する。[1)]
【方法】寿命試験 : 餌である大腸菌を含む液体培地(S 培地)を用いておこなった。まず，初齢幼虫 (L1) を S 培地に移し, 20℃下, 培養を開始した。2 日後に D-Alu と生殖細胞の分裂抑制剤 FUDR を添加し，さらに 2 日間培養した。得られた成虫を培地ごと 48 ウェルカルチャープレートのウェルに移した(2-6 頭/ウェル)。その後，2-3 日おきに線虫の生死を観察し，寿命曲線を作成した。試験した線虫株は，野生株 N2 と以下の変異体 5 種, 遺伝的 DR モデル *eat-2*(咽頭部の動きが弱いため食餌摂取量が少なく，DR 効果により長寿命)と栄養センサー経路関連遺伝子 *daf-16*, *sir-2.1*, *aak-2*, *skn-1* 欠損株である。また，D-Alu が線虫の食餌摂取量を減らし，DR 効果を発揮している可能性が考えられた。そこで，D-Alu の N2 食餌摂取量に対する影響を調査した。培養は寿命試験と同じ条件でおこない，培養 4 日目までの培地の吸光度（600nm）減少を食餌（大腸菌）摂取量とみなした。
【結果・考察】D-Alu の 10mM，25mM 処理は，それぞれ 12%，7%の線虫寿命を延長した。一方，DR モデル *eat-2* では延長効果が認められなかった。このことは D-Alu が DR 効果によって寿命延長していることを示唆している。しかし，D-Alu は N2 の食餌摂取量を減少させなかった。栄養センサー経路関連変異体のなかでは *aak-2* のみが延長効果が認められなかった。*aak-2* は AMP-activated protein kinase (AMPK)の α サブユニットをコードしており，栄養センサーとして働き，線虫寿命を正に調節していることが知られている。D-Alu の寿命延長効果は AMPK を介して発現していると考えられた。以上を総合し，D-Alu は DR メカニズムを介して線虫寿命を延長していると結論づけた。

1）Shintani T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017; **493**: 1528-33.

D-allulose, *Caenorhabditis elegans*, dietary restriction

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B06a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B06 会場

UVA 反復照射により誘導された真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン産生低下におけるじゃがいも皮抽出物の改善効果

Restoration of potato peel extract on type I collagen synthesis in senescence dermal fibroblast induced by multiple UVA exposure

○須藤 麻里[1]、増冨 裕文[1]、遠藤 香凛[2]、石原 克之[1]、正木 仁[2] ([1]カルビー(株)、[2]東京工科大)
○ Mari SUTO[1], Hirofumi MASUTOMI[1], Karin ENDO[2], Katsuyuki ISHIHARA[1], Hitoshi MASAKI[2] ([1]Calbee, Inc., [2]Tokyo Univ. Technology)

【目的】

真皮線維芽細胞において産生されるコラーゲン線維は、細胞外マトリックス成分の主成分であり、皮膚の柔軟性や弾力性維持に寄与する。自然老化や光老化において、真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の著しい減少が観察されており、この現象には線維芽細胞のコラーゲン合成能の低下とコラーゲン分解酵素 MMP-1 の分泌亢進が関与していると考えられている。よって、真皮線維芽細胞のコラーゲン線維の減少を抑制することは、皮膚老化の予防や改善に有効であると考えられる。

じゃがいも（*Solanum tuberosum L.*）は世界の五大食用作物のひとつに数えられており、可食部である塊茎には、様々な機能性成分が含まれていることが知られている。しかしながら、塊茎以外の皮に含有される成分とその機能性については明らかにされていない点が多い。さらに、じゃがいもの加工時に排出される皮については、ゼロエミッションを目指す観点から新たな有効利用法が求められている。しかしながら、じゃがいもの皮の肌に対する作用については知見があまりない。

そこで本研究では、じゃがいも皮抽出物（PPE）を調製し、PPE の正常ヒト真皮線維芽細胞の I 型コラーゲン産生へ与える影響を検討した。さらに、UVA 複数回照射により作製した老化線維芽細胞に対する影響も検討し、知見を得たので報告する。

【方法】

正常ヒト皮膚線維芽細胞に PPE を添加し、24 時間培養後の培養上清中における I 型コラーゲン量を ELISA 法にて測定した。同様の処理を行った細胞より、total RNA を抽出し各種遺伝子発現量を qPCR 法によって確認した。さらに、正常ヒト皮膚線維芽細胞に UVA を 4 日間連続照射し作製した光老化皮膚線維芽細胞についても、I 型コラーゲン量および MMP-1 量を ELISA 法にて測定した。

【結果・考察】

PPE は、正常ヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン産生量を濃度依存的に増加させた。また、PPE は COL1 mRNA の発現を亢進させた。光老化線維芽細胞では I 型コラーゲン産生量は有意に低下し、さらに MMP-1 分泌量は有意に増加した。その光老化線維芽細胞に PPE を添加したところ、コラーゲン合成遺伝子の発現量が改善し、I 型コラーゲン産生量の低下を濃度依存的に改善した。この結果から、PPE にはコラーゲン産生量を回復させることによる光老化改善効果が期待される。

Potato, Photoaging, collagen

発表責任者：須藤麻里（m_suto2@calbee.co.jp）

講演番号：2B06a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B06 会場

ヒト皮膚繊維芽細胞のコラーゲン分解酵素に対する蜜花豆抽出物の作用
The effect of *spatholobus suberectus* extract on collagen-degrading enzymes in human skin fibroblasts.
○草川 太郎[1]、石田 有希子[2]、斉藤 憲二[2]、昆 良子[2]、Binti Jasni Nur Nadia[2]、坂下 真耶[2]、内田 良一[2]、金 武祚[2] ([1](株)フューチャーラボ、[2](株)ファーマフーズ)
○Taro Kusakawa[1], Akiko Ishida[2], Kenji Saito[2], Ryoko Kon[2], Nur Nadia Binti Jasni[2], Maya Sakashita[2], Yoshikazu Uchida[2], Mujo Kim[2] ([1]Future labo Co., Ltd., [2]Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
肌の弾性は真皮組織中のコラーゲンを主体とした細胞外マトリックスにより構築される。そのため、コラーゲンとその分解酵素の量的な平衡状態が破たんすると、肌の弾力が低下し、シワが生じる。そこで我々は、コラーゲン分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP-1）の機能阻害を機序とする新規化粧品素材の開発を目的に、ヒト皮膚由来線維芽細胞(Hs68 細胞)における蜜花豆抽出物の有効性を評価した。

【方法】
定常状態および UV-A 暴露した Hs68 細胞において、MMP-1 遺伝子またはタンパク質発現に対する蜜花豆抽出物の作用を評価した。遺伝子発現はリアルタイム PCR、タンパク質発現はウェスタンブロッティングおよびザイモグラフィーによって定量した。次に、コラーゲンフィルムを用いて、UV-A 暴露した Hs68 細胞のコラーゲン分解酵素活性に対する蜜花豆抽出物の作用を評価した。UV-A 暴露した細胞をコラーゲンフィルム上で培養した後に、未分解のコラーゲンを CBB 染色することにより、細胞から産生されたコラーゲン分解酵素によって分解されたコラーゲン量を可視化した。

【結果】
定常状態の Hs68 細胞において、蜜花豆抽出物は濃度依存的に MMP-1 遺伝子の発現を有意に阻害した。この蜜花豆抽出物の活性は陽性対照に用いたレチノイン酸に匹敵するものであった。UV-A 暴露によって誘導された MMP-1 遺伝子およびタンパク質の発現に対し、蜜花豆抽出物は濃度依存的かつ有意に阻害活性を示した。更に、蜜花豆抽出物はコラーゲン分解酵素の活性も阻害した。以上の結果より、蜜花豆抽出物にはコラーゲン分解酵素の発現阻害を根幹とするシワの予防効果に加え、光老化によるシワの改善効果が期待される可能性が示唆された。現在、ヒト有効性試験で抗シワ効果を検証している。

Spatholobus suberectus, Matrix metalloproteinases, antiaging

講演番号：2B06a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B06 会場

ヒト真皮繊維芽細胞の IL-1α刺激によるエラスターゼ発現に対する *Kaepferia parviflora* 抽出物の作用

Effect of the extract from *Kaepferia parviflora* on the IL-1α-stimulated regulation of skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts.

○小林 桃佳[1]、渡辺 章夫[2]、出口 有佑[3]、遠藤 ゆき[1]、稲垣 恭平[1]、小塚 隆造[3]、古澤 明里[1]、米澤 貴之[2]、禹 済泰[1]([1]中部大応生、[2]中部大生機研、[3]中部大応生院)
○ Momoka KOBAYASHI[1], Akio WATANABE[2], Yusuke DEGUCHI[3], Yuki ENDO[1], Kyohei INAGAKI[1], Ryuzo KOZUKA[3], Akari FURUSAWA[1], Takayuki YONEZAWA[2], Je-tae WOO[1] ([1]Department of Biological Chemisty, Chubu Univ., [2]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [3]Graduate school of Bioscience and Biotech, Chubu Univ.)

【目的】

紫外線暴露による皮膚老化の中でも、シワは重要なアンチエイジングの研究対象である。UVB 暴露によりケラチノサイトから分泌されるサイトカイン（IL-1α など）が真皮繊維芽細胞に作用することでエラスターゼ酵素活性が誘導される。その結果、肌のハリに重要なエラスチンが分解されて真皮の三次元構造が変性することで、皮膚の弾力性が低下しシワが形成される。本研究では、IL-1α によるヒト真皮繊維芽細胞のエラスターゼ活性上昇を抑制する天然素材として、*Kaempferia parviflora*（黒ウコン）から分画したエキスによる抗シワ効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】

Kaempferia parviflora はエタノールで抽出後、液-液分配、逆相系カラムを用いて分画した。ヒト真皮繊維芽細胞を 96 穴プレートに 1.0×10^4 cells/well で播種した。24 時間培養後、サンプルを添加し 2 時間のプレインキュベート後、IL-1α を添加してさらに 72 時間培養後、エラスターゼ酵素活性を測定した。関連遺伝子の発現は定量 RT-PCR 法で解析した。また、細胞生存率は MTT アッセイによって確認した。

【結果】

Kaempferia parviflora エタノールエキスより分画した各画分について検討した結果、60%アセトニトリル溶出エキスにおいて、IL-1α 刺激によるエラスターゼ活性の上昇を有意に抑制することを見出した。さらに、遺伝子発現解析により、IL-1α 刺激 24 時間後に上昇した SFE（ヒト繊維芽細胞由来エラスターゼ)、コラーゲン分解作用を持つ MMP-1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) の遺伝子発現は、60%アセトニトリル溶出エキス添加で有意に低下した。これらの結果から、*Kaempferia parviflora* エタノールエキスから分画した 60%アセトニトリル溶出エキスには、抗シワ効果があることが示唆された。さらに、細胞内シグナル伝達経路を解析することにより 60%アセトニトリル溶出エキスの作用メカニズム解明と活性成分の同定を目指している。

Kaepferia parviflora, Anti-Wrinkle

講演番号：2B06a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B06 会場

Lactobacillus gasseri N320 株による皮膚機能改善効果
Effects of *Lactobacillus gasseri* strain N320 on improvement of skin function.
○上原 和也、砂田 洋介、田中 充、松尾 伸二、田辺 創一、仲村 太志（日清食品ホールディングス（株）・グローバルイノベーション研究センター）
○Kazuya UEHARA, Yosuke SUNADA, Mitsuru TANAKA, Shinji MATSUO, Soichi TANABE, Futoshi NAKAMURA (Nissin Foods Holdings Co., Ltd Nissin Global Innovation Center)

【目的】皮膚は生体内環境と外部環境の境界線である。皮膚の表皮は細菌感染や生体内からの過剰な水分の蒸散を防ぐバリア機能を有し、真皮は線維芽細胞によって産生されるヒアルロン酸、コラーゲンおよびエラスチンによって皮膚構造を維持している。このような表皮や真皮の働きによって、正常な皮膚機能は維持されているが、紫外線刺激や加齢に伴う線維芽細胞の減少・機能低下により、皮膚の老化が引き起こされる。特にヒアルロン酸は皮膚の保湿や細胞増殖に関わるなど、皮膚の恒常性を維持する上で重要であることが明らかになっている。そこで、当社が保有する乳酸菌およびビフィズス菌のライブラリーから、ヒト皮膚細胞におけるヒアルロン酸の産生促進能が高い *Lactobacillus gasseri* N320 を選抜し、ラット反復投与毒性試験などにより安全性を確認した。本研究では、N320 殺菌発酵液摂取による皮膚機能改善効果をヒト試験にて検証した。
【方法】乾燥による肌荒れを自覚する 35 歳以上 59 歳以下の男女計 43 例（男女比約 1:1）を対象として、N320 殺菌発酵液 20 mL を配合した被験飲料あるいはプラセボ飲料を飲用する 2 群に割り付ける二重盲検並行群間比較試験を実施した。8 週間飲用前後に、恒温恒湿状態の測定室にて、皮膚状態を測定・評価した。皮膚水分量は CORNEOMETER CM 825 を用いて測定し、皮膚科医による医師所見および肌のトラブルに関するアンケート調査も実施した。なお、被験者には同意を得た上で、倫理的配慮の下試験を実施した。
【結果】N320 殺菌発酵液摂取群において摂取 8 週間後、プラセボ群と比べて、皮膚水分量の有意な増加が確認された。また、皮膚科医による医師所見において、顔だけでなく背部などでも明らかな保湿効果が確認された。さらに、女性についてアンケート結果を解析したところ、洗顔後のつっぱり感および顔の肌のつやが改善され、メイクのノリの悪さおよび顔のかさつきも改善される傾向が認められた。以上の結果から、N320 殺菌発酵液の摂取により皮膚中の水分量が増加し、皮膚の潤いが保たれることが明らかとなり、N320 殺菌発酵液に皮膚機能改善効果が確認された。現在、作用機序について検討を加えている。

lactic acid bacteria, skin, hyaluronan

発表責任者：上原　和也（kazuya.uehara@nissin.com）

講演番号：2B06a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B06 会場

Anti-aging Effect and Its Mechanism of Plantase Treated Zizania latifolia Extract on Human Dermal Fibroblasts

○Park Se-Ho[1], Seun-Ah Yang[2] ([1]Department of Applied Chemistry, Kumoh national institute of technology, [2]Major in Food Science and Technology, Keimyung University)

The skin is exposed to ultraviolet (UV)-irradiation thus increasing risk for photo-oxidative damage with long-term detrimental effects like photo-aging, which is characterized by wrinkles. This study investigated the effects of plantase treated *Z. latifolia* extract on extrinsic aging and assessed its molecular mechanisms in UVB-irradiated human dermal fibroblasts (HDFs). HDF cells were irradiated with UVB (10 mJ/cm_2) and incubated with *Z. latifolia* extract for 24 h. Treatment with *Z. latifolia* extract had no cytotoxicity effect on HDF cell viability. We also investigated the anti-wrinkle effect of *Z. latifolia* in HDF cells through the expression of type I procollagen, and UVB-induced MMPs release. Our data demonstrated that the *Z. latifolia* extract decreased MMP-1, 2, 3, 9, 13 expressions in HDF cells and increased collagen production (1.56-fold at 50 μg/ml) compared with untreated cells (without UVB irradiation). To study the effect of *Z. latifolia* extract on UVB-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation, we analyzed the protein expressions of superoxide dismutase 1, HO-1 and qualitative analysis with DCF-DA ROS indicator probe. To examine the mechanism the inhibition of *Z. latifolia* extract on NF-κB, MAPK and AP-1 transcriptional activity, we assessed their effects on nuclear translocation and phosphorylation of NF-κB (p-p65 and p-IκBα), MAPK (p-ERK, p-JNK, p-Akt, and p-p38), AP-1 (p-c-Jun and p-c-Fos). In this study, UVB-induced phosphorylation levels of ERK, JNK, and Akt were reduced by the extract, suggesting that *Z. latifolia* extract inhibit UVB-induced MMP family expressions by suppressing MAPK signaling. In addition, we verified that *Z. latifolia* extract increased AMPK phosphorylation in HDF cells. In conclusion, *Z. latifolia* extract showed anti-wrinkle effect via collagen synthesis, MMP-1, 2, 3, 9, 13 expression, inhibition of ROS generation, and inhibition of MAPK, AP-1, and NF-κB expressions. Therefore, the results suggest that *Z. latifolia* extract could be potential functional food material for prevention and treatment of skin photo-aging.

Anti-aging, Zizania latifolia, Collagen synthesis

発表責任者：Seun-Ah Yang（seunahy@gw.kmu.ac.kr）

講演番号：2B06a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B06 会場

食品由来の抗酸化物質における分配係数、細胞生存能に関する比較検討

Comparison of log P and cytoprotection abilities on antioxidants derived from foods

○布田 博敏[1]、上甲 紗愛[1]、渡邉 貢[2]、武田 晴治[1]、古川 貴之[1]、Rojeet Shrestha[1]、惠 淑萍[1]、千葉 仁志[1]([1]北海道大学　大学院保健科学研究院、[2]株式会社渡辺オイスター研究所)
○Hirotoshi FUDA[1], Sae JOKO[1], Mitsugu WATANABE[2], Seiji TAKEDA[1], Takayuki FURUKAWA[1], Shrestha ROJEET[1], Shu-Ping HUI[1], Hitoshi CHIBA[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd.)

【背景と目的】抗酸化物質は活性酸素種（ROS）に直接反応して、不活化する「非細胞性抗酸化物質」、Keap1-Nrf2 経路を活性化し、一連の抗酸化酵素群の発現することにより生体内の ROS や異物を不活化・代謝する「細胞性抗酸化物質」とに分類される。しかし、食品由来の抗酸化物質を区分し、詳しく観察したものはほとんどない。本研究では、マガキ由来の抗酸化物質（DHMBA）、及び食品由来の抗酸化物質を非細胞性と細胞性抗酸化物質に分け、それらの分配係数（Log *P*）、細胞毒性及び細胞保護能について比較・検討を行った。
【方法】DHMBA 及び食品由来の抗酸化物質（ガリック酸、クロロゲン酸、ローズマリー酸、シアニジン-3-O-グリコシド、スルフォラファン、ケルセチン、イソリクイリチゲニン、クルクミン、リコピン）を検討対象とした。細胞毒性試験、及び細胞生存能試験は、Cell Counting Kit-8 を用いて生存細胞数を計測した。Keap1-Nrf2 経路活性化能試験には、抗酸化剤応答配列を有するプロモーターとレポーター遺伝子としてルシフェラーゼが配置されたベクターを用いる Reporter Gene Assay を行った。化学物質の疎水性の指標となる分配係数（Log *P*）において、DHMBA は水とオクタノールを用いた溶解度より測定し、他の抗酸化物質においてはすでに報告されている文献値を用いた。ラジカル消去能試験として ORAC 法を実施した。
【結果と考察】DHMBA、スルフォラファン、ケルセチン、イソリクイリチゲニン、クルクミン、及びリコピンは Keap1-Nrf2 経路を活性化した。一方、クロロゲン酸、ガリック酸、ローズマリー酸、シアニジン-3-O-グリコシドは同経路を活性化しなかったが、有意な ORAC 値を示した。これらの結果より、前者は細胞性抗酸化物質、後者は非細胞性抗酸化物質であった。両者を比較すると、DHMBA とスルフォラファンを除いて、細胞性抗酸化物質は非細胞性抗酸化物質より、高い細胞毒性、Log *P* 値、及び細胞生存能を示していた。一方、DHMBA とスルフォラファンは細胞性抗酸化物質であったが、低い細胞毒性、Log *P* 値及び高い細胞生存能を示していた。これらことから、細胞毒性や Log *P* が低く、高い細胞生存能を有する DHMBA やスルフォラファンは優れた抗酸化物質であり、今後の抗酸化物質探索をする際の指標となりうると考えられた。

antioxidant, Pacific oyster, log P

講演番号：2B06a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B06 会場

ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究

Curcumin metabolism by human intestinal bacteria.

○丹羽 利夫[1]、横山 慎一郎[2]、望月 美佳[3]、大澤 俊彦[3] ([1]修文大健康栄養、[2]岐阜県産業技術セ、[3]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1], Shin-ichiro Yokoyama[2], Mika Mochizuki[3], Toshihiko Osawa[3] ([1]Shubun Univ., [2]Industrial Technol. Center, Gifu Pref. Gov., [3]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】近年大豆イソフラボノイドの腸内細菌による代謝が着目されるにともない、大豆イソフラボノイド以外のポリフェノールの腸内細菌による代謝が報告されてきている。そこで本研究では様々な機能が期待されるクルクミンのヒト腸内細菌による変換について検討することとした。
【方法１】大豆イソフラボノイド代謝菌である YY7918 株および SY8519 株による変換を調べるため、これまでに本研究者らが行ってきた大豆イソフラボノイド代謝研究と同様に GAM (Gifu Anaerobic Medium)にて培養を行ったのち､酢酸エチルによる抽出を行ったものについて TLC 等による検討を行った。
【方法２】ヒト糞便サンプルを 100 microM クルクミンを含む GAM に希釈したのち、96 穴プレートに播種し 2 日間培養を行った後、クルクミンの特徴である黄色を目視にて確認し、薄くなったものについては再度 100 microM クルクミンを含む GAM に希釈、96 穴プレートでの培養を数回繰り返し、すべてのウェルで同様な黄色の減少がみられるようにした。この微生物を 100 mL メディウムビンにて培養し－80℃にて保存した。
この保存菌を 100 microM クルクミンを含む GAM 培地に播種し、500 mL メディウムビン 3 本にて培養した。この培養液の酢酸エチル抽出物を分取 TLC、分取 HPLC により精製し、TLC 上単一スポットとなるまで精製した。
【結果と考察】エクオール産生菌（YY7918 株）ではクルクミンの代謝は確認できなかった。その一方で *O*-desmethylangolensin 産生菌（SY8519 株）ではテトラハイドロクルクミンの生成が確認された。
一方、今回精製したヒト由来腸内細菌ではテトラハイドロクルクミンは確認できなかったが、TLC 上いくつかのスポットが見られた。その中の主たるスポットについて精製を進め ^{1}H NMR を測定したところ、二重結合の消失およびメトキシ基の消失が確認された。また LC-MS/MS 分析の結果この物の分子量は *m/z*：332 と推定された。このことからこの代謝産物の化学構造を 3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)heptane と推定した。

curcumin, metabolite

発表責任者：丹羽　利夫（niwa.to@shubun.ac.jp）

講演番号：2B06a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B06 会場

野菜に含まれる抗酸化力の数値に関する関連性の考察

Consideration of antioxidant capacity include vegetables by some measurements

増水 章季[1]、河野 雅弘[2]、徳田 尚美[1]、高橋 宏樹[1]、久永 真央[1]、○丹羽 真清[1] ([1]デザイナーフーズ株式会社、[2]東京工業大學)
Toshiki MASUMIZU[1], Masahiro KOHNO[2], Naomi TOKUDA[1], Hiroki TAKAHASHI[1], Mao HISANAGA[1], ○Masumi NIWA[1] ([1]Designerfoods Co. Ltd., [2]Tokyo Institute of Technology)

［はじめに］９０年代にアメリカ国立がん研究所（ＮＣＩ）によって、がん予防に有効性のあると考えられる野菜類４０種ほどがデザイナーフーズリストとして公開された。２１世紀になりこれらの活動の成果として、毎年がんの発症を１％程度低下させることに成功しているといわれている。欧米では、毎日、一定量（５種/ｄａｙ、３５０ｇ／ｄａｙ)の野菜や果物を摂取して、各種疾患の発症予防をするための国家的な事業が推進されている。一方、各種疾患の発症に関係するのが酸化力の高い酸素分子種・活性酸素種である。我々は野菜と果物の価値に対して活性酸素種を消去する抗酸化機能として表したいと考え、野菜を中心に抗酸化機能の研究を行ってきた。今回、野菜や果物の持つ抗酸化機能について野菜２７品目を選択し、それぞれの活性酸素種の反応性について検討共通点を見いだした。［方法］デザイナーフーズ（株）で提供している野菜・果物の示す５種類の抗酸化機能の測定値は、次の化学物質を用いて標準物質とし数値化した。各活性酸素測定法及び標準物質はそれぞれスーパーオキシド消去活性（ＳＯＳＡ）：ＳＯＤ、ヒドロキシルラジカル消去活性（ＨＲＳＡ）：ＤＭＳＯ、一重項酸素消去活性（ＳＯＳＡＡ）：ヒスチジン、過酸化ラジカル消去活性（ＯＲＡＣ）：トロロックス、ＤＰＰＨ法：トロロックスで抗酸化物質の評価に準じて行いこの解析では1ｇ相当量として表示し、２種類の測定結果につき比較検討した。［結果］２７種類の野菜類のうちＳＯＳＡとＤＰＰＨラジカルの消去活性は一定の相関性を示すことが明らかとなった。特に１０種の葉菜類、1種のキク類の示すＳＯＳＡとＤＰＰＨ消去に高い相関関係を見出しフリーラジカルと反応し、消去（還元）する物質の存在を示唆している。フェノール類縁化合物がＤＰＰＨと反応していることを考慮すれば、トロロックス換算値０．４５ｇ／ｇ（１．８ｍｍｏｌ）相当の濃度が反応に寄与していると示唆された。(平均値）重量比で推測すると、スーパーオキサイドへの反応性はＤＰＰＨに対する反応性より約１６倍高いと推測され、１０種の葉菜類、２種の茎菜類、１種のキク類の示す２種類の消去能は高い相関関係を示した。ＳＯＳＡとＨＲＳＡは良い相関を示し、一方で傾きが大きく各ラジカル種の反応性が大きく異なることを確認した。ＳＯＳＡとＳＯＳＡＡについては、良い相関を示すが、スーパーオキサイドへの反応性が３桁優位であることが示された。［まとめ］それぞれの葉菜類の共通の成分が、活性酸素種、あるいはＤＰＰＨのラジカルと反応していると推測され、特にＯＲＡＣとＤＰＰＨ法の標準物質はトロロックスであり、プロットの直線の傾きが０．１５という数字より１桁の反応速度が違うと予測された。

reactive oxygen, vegetables, antioxidant capacity

講演番号：2B06a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟南 B06 会場

Arachis hypogaea（ラッカセイ）の葉抽出物の抗酸化活性とその抗酸化物質の主な成分
Antioxidant activities of leaf extracts of *Arachis hypogaea* (peanut) and major constituents of their antioxidants.

○栗原 彩、滝口 泰之（千葉工大工）
○Sayaka KURIHARA, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Tech.)

［背景・目的］
千葉県はラッカセイの一大産地であり，全国の生産量の約 8 割を占める．ラッカセイの種子は，煎る・茹でる事によって食用に利用されるほか，豊富に含む脂肪分から食用油等の加工品として広く使われている．また，ラッカセイには抗酸化物質であるレスベラトロールを含んでいることが知られている[1)]．しかしながら，現段階では葉や茎といった非可食部は産業廃棄物として処理され，有効的な利用方法は見つかっていない．本研究では，ラッカセイの葉のエタノール抽出物の抗酸化活性を測定すると共に，その主な抗酸化物質の分離，同定を検討した．

［方法］
ラッカセイの葉は千葉半立，ブドウの葉は甲州を用いた．採取直後の葉を裁断し，その 1.0 g を 30%エタノール水溶液 15 ml に加えて室温，暗所で 24 時間静置させることで成分の抽出を行った．その後溶液を濾過し,葉を取り除いたものを抽出液とした.抗酸化活性はDPPH 法により測定し,Trolox 相当量として算出した．抗酸化成分の解析のためにラッカセイ抽出液を TLC プレートにスポットし，80%アセトニトリル水溶液で展開させた．展開後，DPPH 溶液を噴霧して観察を行った．また，ラッカセイ抽出液を HPLC によって測定した．HPLC カラムは資生堂製 CAPCELL PAK ODS C18 (4.6×250 mm) を使用し，流速は 1000 μl/min，温度は 40℃，波長 306 nm で検出し，サンプルは 5 μl 注入した．

［結果・考察］
ラッカセイ及びブドウの葉の抽出物には Trolox 換算で 133.0 μmol/g，128.9 μmol/g の抗酸化活性を示した．このことからラッカセイの葉にも多くの抗酸化活性が含まれることが判明した．ラッカセイ抽出液の TLC プレートへの DPPH 溶液の噴霧では複数の抗酸化成分が確認された.HPLC 結果では，ラッカセイ抽出液にはレスベラトロールは含まれなかったが，レスベラトロール配糖体であるピセイドの存在が確認できた．これより，ラッカセイには未知の抗酸化物質が多く含まれていると考えられる．

現在，その他の抗酸化成分について解析を進めている．

1) Victor S. Sobolev and Richard J. Cole, *J. Agric. Food Chem.*, **47**(4), 1435-1439 (1999).

antioxidant activity, peanut, HPLC

講演番号：2B06a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟南 B06 会場

果物に含まれるエポキシカロテノイド及びその酸変換物の抗酸化活性

Antioxidant activities of epoxycarotenoids and their acid conversion derivatives

○下出 早貴、宮田 佳奈、荒木 美智子、加来 奈緒子、原田 桃子、新藤 一敏（日女大・家政・食物）
○Saki SHIMODE, Kana MIYATA, Michiko ARAKI, Naoko KAKU, Momoko HARADA, Kazutoshi SHINDO (Japan Women's Univ.)

【目的】カロテノイドは天然に存在する普遍的な色素であり、植物、藻類、細菌、鳥類や魚類、海生・陸上動物等に含まれるものに加え、人工的に作成されたものも含めると、750 種を超える化合物が報告されている。カロテノイドには抗酸化を始め優れた生理活性を有するものが多いことが、近年の研究の結果から明らかになっている。一方で、マンゴーやオレンジなどの多くの果物にも含有されていながら、構造内にエポキシドを有する（β-イオノン環の 5,6 位）カロテノイドは大変不安定であるため、我々の体内（胃）でどのようにカロテノイドに変換されるのか、また元化合物や変換物がどのような生理活性を持つかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで果物中の代表的エポキシカロテノイドである violaxanthin、9-*cis*-violaxanthin、antheraxanthin、9-*cis*-antheraxanthin について、それらの酸変換物の構造を明らかにすると共に、元化合物、酸変換物の生理活性（抗酸化活性）を詳細に検討することを試みた。

【方法】violaxanthin, 9-*cis*-violaxanthin はマンゴー、antheraxanthin は柿、9-*cis*-antheraxanthin はネーブルをそれぞれ抽出材料とした。飽和重曹水下での細粉化（酸性状態にしない）及びアセトンでの脱水後、CH_2Cl_2-MeOH を用いて溶媒分画、けん化（エステル結合した脂肪酸の除去）、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲル HPLC 分取により、各エポキシカロテノイドを純品に精製した（純度は ^{1}H NMR スペクトルで確認）。次に各エポキシカロテノイドを酸条件で分解し、どのような化合物に変換されるかをシリカゲル HPLC 分取及び分取物の ^{1}H NMR 解析で確認した。最後に各エポキシカロテノイド及び酸変換物の抗酸化活性（ラジカル消去活性：ラット脳脂質過酸化抑制活性、一重項酸素消去活性：メチレンブルーによるリノール酸酸化の抑制活性）を検討した。

【結果】violaxanthin, 9-*cis*-violaxanthin の酸変換では、共に(8*R*,8'*R*) -auroxanthin、(8*S*,8'*R*)-auroxanthin、(8*S*,8'*S*)-auroxanthin が 6:4:1 の割合でできることが初めて明らかになった。また antheraxanthin, 9-*cis*-antheraxanthin の酸変換でも、共に(8*R*)-mutatoxanthin、(8*S*)-mutatoxanthin が 3:2 の比率でできることが初めて明らかになった。

四種のエポキシカロテノイド、auroxanthins, mutatoxanthins の抗酸化活性試験を行った結果、ラジカル消去活性においてはいずれも β-carotene（IC_{50} 72 μM）と比較し優れた抗酸化活性を示すことが確認された（IC_{50} 0.43 μM～2.1 μM）。また一重項酸素消去活性については astaxanthin（IC_{50} 1.2 μM）と比較し穏やかな抗酸化活性を示すことが確認された（IC_{50} 9.8 μM～100 μM）。

Epoxycarotenoids, Acid conversion of epoxycarotenoid, Antioxidant activity

講演番号：2B06p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B06 会場

ヒト皮脂中のスクアレン酸化機構の解析および抗酸化物質によるスクアレン酸化抑制効果の評価

Analysis of squalene oxidation mechanisms in human skin surface lipids and evaluation of the effects of antioxidants on squalene oxidation

○清水 直紀[1]、伊藤 隼哉[1]、加藤 俊治[2]、永塚 貴弘[1]、宮澤 陽夫[1,3]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農、[2]東海大医、[3]東北大未来科学技術共同研究セ)
○Naoki SHIMIZU[1], Junya ITO[1], Shunji KATO[2], Takahiro EITSUKA[1], Teruo MIYAZAWA[1,3], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokai Univ., [3]Tohoku Univ., NICHe)

【背景】ヒトの皮脂は生体と外界の境界に存在し、生体を防御する役割を果たす一方で、環境由来の多くの酸化ストレスに晒されることで、皮脂自身が酸化していると考えられる。スクアレン（SQ）は、その二重結合を 6 箇所に持つ化学構造から、皮脂の中でもとりわけ酸化されやすい脂質であり、酸化されると酸化一次生成物として SQ ヒドロペルオキシド（SQOOH）の 6 種の異性体を生じる。SQOOH は皮脂に蓄積すると、炎症性のニキビやしわの形成などの原因となることが知られているため、SQ の酸化を抑制することで、これらの皮膚の諸症状の緩和が可能であると考えられる。しかし SQ がどのような機構で酸化され、また酸化機構ごとにどのような SQOOH 異性体が生じるかは解明されておらず、そのためどのような抗酸化物質が皮脂中の SQ の酸化抑制に有効であるかは明らかになっていない。そこで本研究では我々が最近報告した LC-MS/MS による SQOOH 異性体の分析法[1]を用いて、皮脂中の SQ がどのような酸化機構を通じて酸化しているかを明らかにするとともに、各種抗酸化物質による SQ 酸化の抑制効果を評価することを目的とした。

【方法・結果】ヒト皮脂から SQOOH を抽出し、上記 LC-MS/MS 法で分析した結果、皮脂中に 6 種の SQOOH 異性体がほぼ等量ずつ存在することが明らかになった。この SQOOH の存在比がどのような酸化機構の影響を反映しているかを評価するために、続いて in vitro で SQ を 3-(1,4-Epidioxy-4-methyl-1,4-dihydro-1-naphytyl) propionic acid（エンドパーオキサイド試薬）を用いた一重項酸素酸化、またはラジカル源となる物質を添加して酸素封入条件下で加熱した。各反応物を LC-MS/MS で分析すると、一重項酸素酸化では各 SQOOH 異性体がほぼ等量ずつ生成するのに対し、ラジカル酸化では、生成効率は低いものの、一部の異性体が特徴的に生成することが明らかになった。以上より、ヒト皮脂中の SQ は主に一重項酸素酸化によって酸化されていることが示唆された。さらに、抗酸化物質による SQ 酸化の抑制効果を評価することを目的として、上記の SQ in vitro 一重項酸素酸化系に β-カロテンを添加して SQ を酸化した。その結果、SQOOH の各異性体の生成が β-カロテンの濃度依存的に抑制されたことから、β-カロテンに代表される一重項酸素のクエンチャーは SQ 酸化の抑制、ひいては皮膚の諸症状の緩和に有効であることが示唆された。

[1] Shimizu N. et al., *J. Oleo. Sci.* **66**: 227–234 (2017).

squalene monohydroperoxide, LC-MS/MS, β-carotene

講演番号：2B06p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B06 会場

イオンモビリティーを活用した過酸化リン脂質の LC-MS/MS 立体異性体解析法

Stereoselective analysis of phosphatidylcholine hydroperoxide using a LC-MS/MS method with ion mobility.

○伊藤 隼哉[1]、加藤 俊治[2]、永塚 貴弘[1]、宮澤 陽夫[1,3]、仲川 清隆[1]（[1]東北大院農、[2]東海大医、[3]東北大未来科学技術共同研究セ）

○Junya ITO[1], Shunji KATO[2], Tkahiro EITSUKA[1], Teruo MIYAZAWA[1,3], Kiyotaka NAKAGAWA[1]（[1]Tohoku Univ., [2]Tokai Univ., [3]Tohoku Univ., NICHe）

【目的】リン脂質（ホスファチジルコリン, PC）の過酸化により、過酸化リン脂質（ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド, PCOOH）が生じ、疾病の発症や食品の劣化に関与すると示唆されている。この PC の過酸化反応には、ラジカル酸化や酵素酸化、一重項酸素酸化があげられる。その中で、リポキシゲナーゼ（LOX）による酵素的な酸化反応は、生体や食品で重要な役割を担うと予想される。LOX による酵素酸化では、ヒドロペルオキシ基が立体選択的に付加し、*S* 体のヒドロペルオキシドが生じる。したがって、PCOOH が有する脂肪酸ヒドロペルオキシドの立体異性を評価できれば、生体や食品のリン脂質過酸化における酵素酸化の役割を明らかにできると考えられる。既に我々は、キラルカラムを用いた LC-MS/MS 分析により、PCOOH の立体異性体分析を達成し、PCOOH の立体異性体の比率（*R* 体と *S* 体の比率）から酵素酸化の関与を評価できる方法を構築した[1,2]。他方、近年の開発技術の向上が著しい質量分析器では、イオンモビリティーと呼ばれる新しい解析技術（イオン化された化合物の衝突断面積の違いによる分離技術）が導入され、異性体解析への応用が期待されている。そこで本研究では、イオンモビリティー解析が可能な質量分析器を用いて、PCOOH の立体異性体解析の可能性を検討した。

【方法】はじめに、リノール酸をラジカル酸化させ 13(*RS*)-hydroperoxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid（13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE）を単離し、1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine（16:0 Lyso PC）とのエステル縮合により 1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（16:0/13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC）を調製した。同様に LOX とリノール酸、16:0 Lyso PC を用いて 16:0/13(*S*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC を調製した。これらの標品と質量分析器（QTRAP 6500+（SCIEX））を用いて、イオンモビリティー解析による PCOOH の立体異性体分離を試みた。

【結果・考察】調製した 16:0/13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC を用いて、イオンモビリティーの各種条件を最適化した。その結果、イオンモビリティーにより、キラルカラムを用いずとも、通常のカラムを備えた LC-MS/MS で 16:0/13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC の立体異性体の分離が可能となった。この分離の確かさは、16:0/13(*S*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC やキラルカラム（CHIRALPAK OP（+））を備えた LC-MS/MS による検討で証明することができた。本イオンモビリティーを活用した LC-MS/MS 法は、通常のカラムを使用できる点で簡便かつ汎用性が高い。実試料への応用により、生体や食品における酵素的脂質過酸化の役割をより明確にできると期待される。

[1] J. Ito, et al., *J. Chromatogr. A*, 1386, 53-61 (2015)

[2] J. Ito, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 7785-7793 (2016)

LC-MS/MS, Ion mobility, phosphatidylcholine hydroperoxide

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2B06p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B06 会場

醤油粕由来セラミドの吸収機構と皮膚機能改善作用

Absorption and skin improving effect of dietary ceramides originated from soy sauce lee

太田 知志[1]、開 忍[2]、宮鍋 征克[2]、植木 達朗[3]、真鍋 祐樹[1]、○菅原 達也[1]([1]京大院農、[2]（株）ジェヌイン R&D、[3]福岡県醤油醸造協同組合)

Kazushi OHTA[1], Shinobu HIRAKI[2], Masakatsu Miyanabe[2], Tatsurou UEKI[3], Yuki MANABE[1], ○ Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]GenuineR&D, [3]Fukukoka Soy sauce Brewing Cooperation)

【目的】スフィンゴ脂質は、真核生物に普遍的に存在することから、様々な食品に含まれており、日常的に摂取されている。近年、その食品機能性が評価され、大腸がん発症抑制作用や脂質代謝改善作用などが報告されている。とくに皮膚に対する効果が注目されており、様々な食品素材由来のグルコシルセラミドやスフィンゴミエリンによる皮膚バリア機能改善作用が報告されている。これらはヒト表皮セラミドとは組成が異なるにもかかわらず効果を示すことから、そのメカニズムに興味がもたれる。一方、食品残渣である醤油粕から調製されたセラミド素材は、グルコースやリン酸コリンなどの極性基を持たない遊離のセラミドであり、ヒト表皮に存在するセラミドと類似した構造も含む。本研究では醤油粕由来セラミドの食品機能性成分としての有用性を評価するために、マウスを用いて、その消化管吸収と皮膚バリア機能に与える影響を調べた。
【方法】消化管吸収について評価するために、ICR マウスに醤油粕由来セラミドを経口投与し、3 時間後の血漿に含まれるセラミド分子種について LC-MS を用いて解析した。さらに 0.1%醤油粕由来セラミドまたは 0.1%トウモロコシ由来グルコシルセラミドを配合した試験食をヘアレスマウスに 2 週間自由摂食させ、経皮水分蒸散量（TEWL）、角層水分量、粘弾性などの皮膚性状について測定した。
【結果】LC-MS/MS 解析の結果、醤油粕由来セラミドに含まれる分子種については、スフィンゴイド塩基としてトリヒドロキシ型の t18:0 が主要であり、t18:1、t19:0、t20:0 が含まれていた。脂肪酸としてはヒドロキシ型の C24:0 が主要であり、C22:0、C23:0、C25:0 が含まれていた。さらにジヒドロキシ型脂肪酸も存在した。醤油粕由来セラミドを経口投与したマウス血漿から、投与した醤油粕由来セラミドに含まれるセラミド分子種が検出され、その組成も投与試料に類似していた。一方、未投与マウス血漿からはこれらのセラミド分子種はほとんど検出されなかった。したがって、経口摂取されたセラミドが消化管から消化を受けずに直接吸収され、血中へ移行する可能性が示された。また、0.1%醤油粕由来セラミド食で飼育したヘアレスマウスは、コントロール食に比べて、経皮水分蒸散量が有意に低下した。この効果は、トウモロコシ由来グルコシルセラミドと比較しても同等以上であった。以上の結果から、消化管を介して生体内へと吸収された醤油粕由来セラミドは、皮膚バリア機能の向上に寄与すると考えられた。

Cearmide, Skin, Absorption

講演番号：2B06p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B06 会場

魚油含有脂肪強化食が老化による脂質吸収能に与える影響

The effect of lipid-enriched diet containing fish oil on lipid absorption ability with aging

○山本 和史、都築 毅（東北大院・農）
○Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】近年、高齢者の低栄養が大きな問題となっている。我々はこの問題の要因の一つとして、高齢者の消化管吸収能低下に着目したところ、老化により脂質吸収能が低下することをマウスで示した[1]。この解決法として老齢時からの高脂肪食給餌を行ったところ、高脂肪食は、老化による脂質吸収能低下を抑えることができたが、同時に血清や肝臓の脂質蓄積を強く誘導してしまった[2]。そこで本研究では、このような脂肪強化食による悪影響を抑えつつ、脂質吸収能低下を抑えるために、中脂肪食や魚油に着目し、これらが与える影響を検討することとした。
【方法】実験動物として老化促進マウスである SAMP8 マウス（3 ヶ月齢、雄性）を用いた。6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育する Baseline 群、15 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育する Control 群、6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育しそれ以降 15 ヶ月齢まで中脂肪食（8%脂肪食）で飼育する MF 群、6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育しそれ以降 15 ヶ月齢まで魚油を含む中脂肪食（1.6%魚油食）で飼育する MF+FO 群の計 4 群を作成した。既定の月齢に達した後に屠殺を行い各種分析に供した。
【結果】経口脂質負荷試験を行ったところ、脂質吸収曲線下面積の変化は Baseline 群に対し Control 群や MF 群で有意に低下したが、MF+FO 群でその低下が軽減されていた。これを受け、脂質吸収に関わる組織の老化マーカーや脂質吸収に関わる遺伝子の発現量を調べたところ、肝臓 p16 が老化の進行により、増加していた一方で MF 群や MF+FO 群でその増加が抑えられていた。また、小腸 Apob、Fatp4、Mttp が老化により低下したが、MF 群、MF+FO 群によりその低下は軽減されていた。さらに、小腸の組織学的観察を行ったところ、老化による小腸の絨毛退化が示されたが、MF+FO 群で絨毛退化が大きく抑えられていた。以上より、魚油を含む中脂肪食の摂取により、老化による小腸の絨毛退化を抑制し、老化による脂質吸収能低下を抑制することが示された。さらに、この中脂肪魚油食は老化により誘導される様々な生体パラメーターの変化を悪化させず加えて、老化による肝臓 TC 蓄積や肝機能低下を抑制することも示された。故に、中脂肪魚油食は高齢者にとって有益な食事となり得ることが考えられた[3]。

[1] K. Yamamoto et al. *Biogerontology* 2014;15:463-473.
[2] K. Yamamoto et al. *J Clin Biochem Nutr* 2015;57:204-211.
[3] K. Yamamoto et al. *Nutrition* in press.

aging, lipid absorption, fish oil

講演番号：2B06p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B06 会場

溶解剤としてのターメリックオイルはセサミン・セサモリンのマウス脳内移行を向上させる
Using turmeric oil as solvent improves the distribution of sesamin-sesamolin in mouse brain
○岩本 和子[1]、松村 晋一[2]、吉岡 百合[2]、久後 裕菜[1]、橋本 佳祐[1]、宮本 智絵[1]、星野 健斗[1]、財満 信宏[1]、森山 達哉[1]([1]近畿大農、[2]稲畑香料)
○Kazuko IWAMOTO[1], Shinichi MATSUMURA[2], Yuri YOSHIOKA[2], Hirona KUGO[1], Keisuke HASHIMOTO[1], Chie MIYAMOTO[1], Kiyoto HOSHINO[1], Nobuhiro ZAIMA[1], Tatsuya MORIYAMA[1]
([1]Kindai Univ., [2]INABATA KORYO)

アルツハイマー病(AD)は、進行性の老年期痴呆を伴う大脳神経変性疾患の一つであり、脳内にアミロイドβペプチド(Aβ)を主成分とする老人班が広く観察される。このAβ産生において、セクレターゼ酵素が重要な役割をしており、セクレターゼ制御が AD の予防にとって重要な課題となっている。これまでに、我々はゴマ(*Sesamun indicum* 種子)由来のセサミン（S1）及びセサモリン（S2）にβ -セクレターゼ阻害作用を見出し、これら化合物のマウス経口投与による血中および脳への移行を明らかにした。本研究では、S1、S2 の脳移行率改善を目的として、ゴマ抽出物(SE：S1 および S2 をそれぞれ 40%含有)を溶解する溶剤を食品素材より検索するとともに、それら化合物の脳移行への最適な条件を検討した。

11 種類の食品由来の溶剤を用いて SE の溶解度を検討したところ、ウコン（*Curcuma longa* の根茎）精油（TO）が SE を約 15%（w/w）溶解することを見出した。我々は過去に、TO の主成分であるターメロン類がβ -セクレターゼ阻害作用を有することを報告している。そこで、SE および TO に SE を 13.5%(w/w) 溶解した溶解物(TSO)を 2%CMC 溶液に分散させたものを被検体とし、Slc ： ddy 系雄性マウスにそれぞれ経口投与し、血清および脳中の有効成分濃度を LC-MS/MS で測定した。S1 および S2 の血清および脳内濃度は、SE 単体投与群より TSO 投与群のほうが有意に増加した。ターメロン類の濃度においても、単体投与より TSO 投与のほうが血清および脳内濃度の増加傾向がみられた。TSO の投与濃度の違い(12.5、25、50mg/kg)においては、投与濃度依存的に S1 および S2 の血清および脳中の濃度が有意に増加することが明らかになった。更に、TSO の粒子径の違いによる投与では、粒子径 1.98 および 18.01μm 群と比較して粒子径 0.58μm の投与群で S2 の血清および脳内濃度は有意に増加した。被検体およびβ-セクレターゼを蛍光基質と反応させ、生成した蛍光ペプチド断片を蛍光 HPLC を用いて定量し、コントロールとの比較により酵素阻害活性を測定したところ、TSO 濃度 25、100ng/mL で 9、19%と TSO 投与群の脳内濃度に近い濃度で阻害作用が示された。以上のことより、SE、TO の単体での摂取よりも TSO での摂取において、有効成分の血清および脳への移行率が増加することが明らかになった。また、β-セクレターゼ阻害作用において、マウスの TSO 投与群の脳内濃度に近い濃度で阻害活性がみられたことから、TSO は AD の予防機能を有する可能性が示唆された。

Turmeric oil, Sesamin, Sesamolin

発表責任者：財満信宏（zaima@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B06p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B06 会場

白米ペプチドに含まれる睡眠ホルモン合成酵素活性化因子

Activating factor of serotonin N-acetyltransferase from rice peptides

○畑中 唯史[1]、守谷 智恵[2]、川上 賀代子[2]、藤田 明子[3]、川上 晃司[3]、下田 博司[4]、坪井 誠二[2] ([1]岡山県生物科学研究所、[2]就実大薬、[3]株式会社サタケ、[4]オリザ油化株式会社)
○Tadashi Hatanaka[1], Chie Moritani[2], Kayoko Kawakami[2], Akiko Fujita[3], Koji Kawakami[3], Hiroshi Shimoda[4], Seiji Tsuboi[2] ([1]RIBS, Okayama, [2]Shujitsu Univ., [3]SATAKE Co. Ltd., [4]ORIZA OIL and FAT Chem. Co. Lt)

[背景と目的]

寝不足の原因は、不規則な生活様式を強いられることで、睡眠異常等の概日リズム障害や、その要因のひとつとして考えられる、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。メラトニンは、血中より供給される L-トリプトファンを前駆物質として、トリプトファンヒドロキシラーゼと芳香族-L-アミノ酸デカルボキシラーゼの 2 つの酵素によりセロトニンに変換された後, セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される、脳内の松果体で合成される睡眠ホルモンである。これらの酵素のうち NAT が最もよく時間情報に応答し、 その活性は強いリズム性を示す。つまり、 NAT 活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応しており、NAT はメラトニン合成の律速酵素である。本発表では、白米ペプチドに含まれる NAT 活性化因子の同定を試みたので報告する。

[結果と考察]

市販白米ペプチドを、逆相固相担体（Sep-PakC18）に吸着させ、40%メタノールで溶出することによって、NAT を活性化させる因子が濃縮される画分を得た。さらに、HPLC-C18 カラムによる分画を行った。評価法は、以下の通り。動物細胞用発現ベクターに、NAT 遺伝子を組み込み、COS-7 細胞に形質転換し、NAT 発現細胞（COS/NAT 細胞）を得た。COS/NAT 細胞を 48 時間培養し、被験物質を添加し、24 時間共培養した。1 mM 過酸化水素添加培地に交換し、30 分間処理を行った。回収した COS/NAT 細胞を、ホモジナイズし、遠心上清を回収した。上清に対し、アセチル Co-A およびトリプタミンを含む緩衝液を加え、反応させた。その後、氷冷したトルエン／イソアミルアルコール／ 1 N 塩酸混液を加え、反応を停止させ、激しく振とう後遠心し、有機溶媒相を回収し、溶媒を留去した。得られた乾燥物を、HPLC 用移動相に溶解し、生成した N-アセチルトリプタミンを定量することにより、NAT 活性を測定した。その結果、NAT 活性化因子が濃縮される画分を、イオントラップ型 LC-MS 分析にかけ、配列を同定したところ、3 種のペプチド配列を見出した。解析で見出した配列を持つペプチドを人工合成し、3 種のうち 2 種のペプチドが有意に NAT 活性を上昇させることを確認した。

rice, peptide

発表責任者：畑中唯史（hatanaka@bio-ribs.com）

講演番号：2B06p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B06 会場

Long-term administration of *Lactobacillus paracasei* K71 isolated from sake lees prevents cognitive decline in senescence-accelerated mouse prone-8, SAMP8

○Henry Marzo Corpuz[1], Shigeru Katayama[2], Takakazu MItani[2], Toshihiro Mihara[3], Takehisa Kumagai[3], Soichiro Nakamura[1,2] ([1]Interdiscip Grad. Sch. of Shinshu Univ., [2]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [3]Kameda Seika CO., Ltd.)

【Purpose】Recent studies have shown that the gut microbiota is involved in the pathophysiology of a variety of neuropsychological diseases and contributes to brain development and function in mice and humans. Resident intestinal bacteria might communicate with the host through the microbiota–gut–brain axis to influence behavior and brain functions. It has been previously reported that administration of probiotics could help alleviate chronic-stress induced behavioral disorders but their preventive effects on age-related cognitive decline has not yet been investigated. Thus, the purpose of this study was to determine the effects of long-term oral administration of *Lactobacillus* strains on cognitive improvement in SAMP8 mice, which display early development of a variety of aging-related symptoms, particularly memory and cognitive deficits.

【Materials and Methods】*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 and *Lactobacillus paracasei* K71 strains isolated from rice and sake lees, respectively, were used in this study. Female SAMP8 mice at 14-week-old were fed with diet supplemented with 0.05% (w/w) heat-killed *Lactobacillus* strains for 42 weeks and then subjected to cognitive tests including Barnes maze and passive avoidance tests.

【Results】During the administration period, there were no significant differences in the body weight and feed consumption among the test groups. In the Barnes maze test, *L. paracasei* K71 fed group significantly decreased the latency to find the goal box compared with control group, whereas *L. casei* subsp. *casei* 327 fed group did not, suggesting that oral administration with *L. paracasei* K71 resulted in improved cognitive ability of aged SAMP8 mice. In the passive avoidance test, similar results were observed and *L. paracasei* K71 administration increased the step-through latency to enter the dark compartment. These suggest that long-term administration of sake lees-derived *L. paracasei* K71 prevents cognitive decline in SAMP8.

Lactobacillus, SAMP8, microbiota

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B06p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B06 会場

山ウドのアンチエイジング効果と神経変性疾患予防効果について

Aralia cordata extends life span and protects neurodegeneration in Caenorhabditis elegans

○川住 亮之、春原 天真、宮島 まどか、名取 貴光（山梨学院大・健康栄養）
○Ryono Kawasumi, Tenshin Sunohara, Madoka Miyajima, Takamitsu Natori (Yamanashi Gakuin Univ.)

【目的】野山に自生する山菜の多くは古くより食用として好まれてきた。また、これら山菜の中には様々な効能をもつ成分が含まれており、生薬としても用いられている。山菜をはじめとして、植物由来成分には、抗腫瘍効果や抗酸化作用、抗菌活性、抗肥満作用など様々な生理機能が報告されている。近年は食品成分の機能性に対する関心も高まっており、山菜における機能性の研究も数多く進められている。一方、本研究で対象とした山ウドに関してはこれまで抗酸化作用以外の機能性については全く報告がなされていない。山ウドには、クロロゲン酸やケルセチン、ケンフェロールなどが多く含まれることが明らかにされており、これまでに報告されていない機能性が存在する可能性も高いと思われる。そこで、我々は、山ウドに新たな機能性を見出すべく、寿命延長と神経変性疾患の予防効果の有無について検討を行うこととした。
【方法】長野県小谷村で採取した山ウドを凍結乾燥した後、粉末とし、80%メタノール（MeOH）にて有効成分の抽出を行った。抽出画分を濃縮・乾固した後、ジメチルスルホキシドに再溶解して各濃度に調製したものを試料とした。試料溶液を線虫（*C.elegans*）fer-15 株の液体培養系へ添加して寿命に対する影響を検討した。また、アルツハイマー病（AD）の疾患モデル線虫である CL4176 および CL2355 株、パーキンソン病（PD）の疾患モデル線虫である BZ555 および NL5901 株を用いて、山ウドの神経変性疾患の予防に対する効果について検討を行った。
【結果】線虫（fer-15）の培養系に山ウドの試料溶液を添加したところ、有意な寿命延長効果は認められなかった。しかし、山ウドにはクロロゲン酸やケルセチン、ケンフェロールが含まれていることが明らかであったため、これらポリフェノールを直接投与し線虫の寿命への影響を検討したところ有意な寿命延長効果がみとめられた。粗抽出液の分画の必要性も考えられる結果ではあったが、山ウドに寿命延長効果がある可能性が示唆された。一方、AD モデル線虫の CL4176 に山ウドの試料溶液を投与したところ、有意なアミロイドβ毒性に対する保護効果が認められた。また、PD モデル線虫の BZ555 に山ウドの試料溶液を投与したところ、ドーパミン作動性神経細胞に対する有意な保護効果が認められた。
　以上より、山ウドには線虫の寿命延長を導く効果と AD や PD などの神経変性疾患を予防する効果のあることが明らかとなった。

Life span, Aralia cordata, Neurodegenerative disease

講演番号：2B06p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B06 会場

クロレラの投与は認知症モデルマウスにおける認知記憶障害及び神経変性の進行を緩和する

Administration of *Chlorella* mitigate cognitive impairment and progression of neurodegeneration in dementia model mice

○中嶋 裕也[1]、大澤 郁朗[2]、管野 敏博[1]、太田 成男[3] ([1]クロレラ工業株式会社、[2]東京都健康長寿医療センター研・生体環境応答、[3]順天堂大学大学院・神経学)
○Yuya Nakashima[1], Ikuroh Ohsawa[2], Toshihiro Kanno[1], Shigeo Ohta[3] ([1]Chlorella Industry Co. Ltd, [2]Biol. Process Aging, Tokyo Metro. Inst. Gerontol., [3]Dept.Neuro., Gradu.Sch of Med., Juntendo. Univ.)

加齢に伴う酸化ストレスの増大は、アルツハイマー病などの神経変性疾患の大きな原因の一つと考えられている。単細胞緑藻であるクロレラは蛋白質、ビタミン、ミネラル、食物繊維等が含まれており、健康食品として長年利用されている。また、ルテインやβ - カロテンといったカロテノイド類も豊富に含まれているため、酸化ストレスに対する抑制効果も期待できる。実験に供した認知症モデルマウス（DAL101）は、脳のミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素 2（ALDH2）活性を抑制することにより、脂質の過酸化より派生する毒性の高いアルデヒド（4 - ヒドロキシ - 2 - ノネナール）の蓄積を増大させ、加齢に伴い認知記憶障害を示す[1)]。この DAL101 マウスに対し、クロレラの長期投与による認知症予防効果について検討した。

生後 12 ヶ月齢の DAL101 マウスに基本飼料 CE-2（対照群）及び 1%クロレラ添加食（クロレラ投与群）を 6 ヶ月間にわたって自由摂食により投与した。また、正常群として、C57BL/6 マウスに基本飼料 CE-2 を投与した。投与期間中、対照群の雌性マウスにおいて、有意な生存率の低下が確認されたが、クロレラ投与群に生存率の低下は認められなかった。投与 6 ヶ月後の認知機能は、モリス水迷路試験及び新奇物体認識試験と 2 種の行動試験で評価した。その結果、クロレラの 6 ヶ月間の投与は認知記憶障害を抑制することが認められた。また、行動試験終了後、酸化ストレスに対する評価として、血漿中のカロテノイド類（ルテイン＋ゼアキサンチン）含量及び脳組織、血漿中の酸化ストレスマーカーの測定を行った。クロレラ投与群にのみカロテノイド類の上昇が確認され、脳組織及び血漿の酸化ストレスマーカー値はクロレラの投与により抑制されていた。次に脳組織の NeuN 抗体による免疫染色を行い、海馬の神経細胞数に与える影響について検討を行った。対照群に顕著に観察された神経細胞の脱落をクロレラ投与群は抑制していることが示された。これらの結果より、クロレラの投与は加齢に伴う酸化ストレスの増大の抑制に関与し、神経細胞保護に働くことで、アルツハイマー病などの神経変性疾患を予防する可能性が示唆された。

1）Ohsawa I *et al.* J Neurosci.28: 6239-49 (2008)

chlorella, dementia, oxidative stress

発表責任者：中嶋裕也（yuya_nakashima@chlorella.co.jp）

講演番号：2B06p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B06 会場

老化促進モデルマウス（SAM）の学習力と獲得記憶のストレス誘導性減衰はカキ熱水抽出物の経口摂取により抑制される　－食品と記憶に関する研究　IV－

Loss of learning memory of Senescence-Accelarated Mouse(SAM) are prevented by orally administrated Oyster extracts

○松田 桂[1]、木屋 佳奈恵[1]、香林 美紅[1]、網野 友香[1]、松田 芳和[2]、河村 幸雄[1]([1]京都女子大学・院、[2]日本クリニック株式会社)
○ Katsura MATSUDA[1], Kanae KIYA[1], Miku KOUBAYASI[1], Yuka AMINO[1], Yoshikazu MATSUDA[2], Yukio KAWAMURA[1] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]Japan Clinic Co.,Ltd)

【目的】加齢や認知症のような病的状態により進行する認識力や記憶の減衰が、食品（成分）により予防や改善ができるかは、未知の研究領域である。昨年度、正常マウスの空間位置認識記憶がストレスにより減衰すること、およびその減衰がカキ（*Crassostrea gigas*）抽出物の経口摂取により抑制される事を示した。今回は加齢の影響を明らかにする目的で、老化促進モデルマウス(Senescence-Accelerated Mouse、SAM)の学習力と獲得記憶のストレス誘導性減衰に対するカキ抽出物の影響を検討した。

【方法】老化促進モデルマウス群として SAM-P8(♂、13 週齢)、老化症状対照群として 正常老化モデルマウス SAM-R1(♂、13 週齢)を用いた。それぞれの群にカゼイン食群とカキ食 (5%) 群をもうけた。SAM の空間位置の認識と学習は Morris の「水迷路試験法」に準じて測定した。直径 120×高さ 50cm の円柱形プールに水を張り、その中心に視認可能な水面上 1cm に直径 9cm の透明な円柱プラットフォーム（以下 PF）を設置、1 日 5 回 1 週間遊泳させその位置記憶を定着させた（学習ステップ）。定着した学習記憶（の保持と減衰）に対するストレス負荷は、1 日 1 回 1 時間、水中閉所拘束ストレスを 1 週間行うことに依った（ストレス負荷ステップ）。ストレス負荷終了 2 日後、ストレス負荷群と非負荷群につき、PF を同位置で水面下 1.0cm に沈め、マウスが視認できない PF を発見到達するまでの軌跡と時間を測定し、記憶の保持または減衰の指標とした（記憶減衰評価ステップ）。

【結果】①SAM マウスによる水面上 PF の発見到達は、1 日連続 5 回、6 日間の学習で 4 群すべてで若干の差は認められたが速くなった（学習記憶）。しかし、SAM-P8 群は SAM-R1 群より発見到達に時間を要し加齢の影響が考えられた。カキ食は、SAM-P8 と R1 の両群でカゼイン食に比べて学習に良い傾向が認められた。②１週間のストレス負荷により SAM-R1 群では、カゼイン食、カキ食の両群で PF の発見到達時間が学習前と同じで獲得記憶の喪失が認められた。一方、SAM-P8 群ではカゼイン食群で SAM-R1 群と同じく獲得記憶が失われていたのに対してカキ食群では学習最終日の到達時間と同じで獲得記憶は完全に維持されていた。この結果は、学習開始の 1 週間前から餌に混ぜて摂食していたカキ抽出物が、ストレス誘導性の記憶衰弱を抑制していることを強く示唆している。この記憶保持は、ストレス負荷後１ヶ月では失われていた。ストレス負荷後の行動（自発運動）に大きな差は観察されないので、この摂取カキ抽出物による記憶減衰抑制が、抗ストレス作用によるのかまたは記憶の保持そのものに影響したのかは、現在検討中である。

Loss of memory, Senescence-Accelarated Mouse(SAM), Oyster extracts

講演番号：2B06p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B06 会場

廃糖蜜の DPPH ラジカル補足能の測定と XAD 樹脂による抗酸化物質の精製

DPPH-radical scavenging activity in sugarcane molasses and purification of the antioxidative compounds with XAD resin

○滝口 泰之、古賀 美里、山口 達明（千葉工大工）
○Yasuyuki TAKIGUCHI, Misato KOGA, Tatsuaki YAMAGUCHI (Chiba Institute of Technology)

［背景・目的］
活性酸素は細胞を損傷し、食品の劣化を引き起こすため、活性酸素の除去能をもつ抗酸化物質は健康食品や食品添加物として有用である。現在、緑茶由来のカテキンやアスコルビン酸などが利用されているが、サトウキビ由来の廃糖蜜にも含まれていることが報告されている[1)]。本研究は廃糖蜜の抗酸化能を DPPH 法で測定するとともに、国際腐植物質学会によるフルボ酸の精製法（IHSS 法）を参考に、抗酸化物質の精製を試みた。
［実験方法］
廃糖蜜は宮古島製糖株式会社から提供していただいたものを使用した。抗酸化能は DPPH（1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl、東京化成製）をエタノールに濃度が 800 μmol/L になるように溶解し、この試薬 1.0 ml、50%エタノールに溶解した試料 2.0 ml、200mM-MES 緩衝液（pH6. 0）水溶液 1.0 ml を試験管入れ，攪拌混合後，室温で 20 分間放置後の 520 nm の吸光度をトロロックス相当量（TE）として算出した。また、抗酸化物質は 10%廃糖蜜水溶液にパン酵母を加えて 28℃で 2 日間培養して糖分を除去後に、IHSS 法に従って XAD 樹脂に吸着させ，40%エタノール水溶液で黒色画分を脱着し、凍結乾燥法で固形物として回収した。
［結果・考察］
廃糖蜜の抗酸化能は 125. 9 μmolTE/g であった。廃糖蜜 22.0 g の XAD 樹脂吸着画分から抗酸化物質 1.019 g の抗酸化物質が得られた。この抗酸化物質は黒色粉末であった。精製された抗酸化物質の抗酸化能は 314.9 μmolTE/g であり、制製品の抗酸化能は原料の 3 倍近く上昇した。廃糖蜜由来の抗酸化物質の赤外吸収スペクトルの形状は土壌から得られたフルボ酸のものによく似ており、1620 cm^{-1} に芳香族二重結合に由来する吸収が、1720 cm^{-1} にカルボニル基に由来する吸収が、3400 cm^{-1} 付近に水酸基に由来する吸収がみられた。廃糖蜜はサトウキビ由来の物質で安全性が高いと予測できるので，廃糖蜜から得られた抗酸化物質は食品や化粧品などの添加物質として利用できると思われる。

１）氏原邦博ら，日本食品科学工学会誌，60(4)，159-164（2013）.

sugarcane molasses, DPPH-radical scavenging activity, antioxidative compound

発表責任者：滝口泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：2B06p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B06 会場

アミロイドβ誘導性神経細胞死に対するシアニジン-3-グルコシドの抑制効果
Protective effect of cyanidin-3-glucoside against amyloid beta-induced neuronal cell death
○石橋 実学[1]、池田 彩[2]、原 崇[2]、池内 健[3]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[2]、西澤 正豊[3]、山崎 彬[5]、小林 篤[5]、大坪 研一[4] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命、[5]越後製菓)
○ Mitsuhisa ISHIBASHI[1], Aya IKEDA[2], Takashi HARA[2], Takeshi IKEUCHI[3], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[2], Masatoyo NISHIZAWA[3], Akira YAMAZAKI[5], Atsushi KOBAYASHI[5], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [5]Echigo Seika Co., Ltd.)

【目的】

黒米は，アルツハイマー病予防効果が期待される[1)]。アルツハイマー病の病理学的特徴は脳萎縮，老人斑および神経原線維変化であり，老人斑と神経原線維変化の構成成分はそれぞれアミロイドβ（Aβ）とリン酸化 Tau である。演者らは，黒米の抗アルツハイマー病活性について検討中である。本研究では，生理的な濃度（1～10 nM）の Aβ42 が神経系培養細胞（SK-N-SH，Neuro 2a）の細胞死および Tau リン酸化を誘導するか確認し，黒米糠主要色素である cyanidin-3-O-glucoside（Cy3G）が Aβ42誘導性細胞死，リン酸化 Tau および活性酸素種（ROS）の細胞内レベルに及ぼす影響について検討した。

【方法】

神経細胞モデルとして，ヒトおよびマウスの神経芽細胞腫細胞株（SK-N-SH および Neuro 2a）を用いた。また，Tau のリン酸化について評価する目的で，Neuro 2a 細胞にヒト Tau（4N1R）を安定発現させた Neuro 2a MAPT 細胞を用いた。細胞死は MTT 法，アポトーシスは Annexin V を指標とした FACS 解析，細胞内の活性酸素種（ROS）は DCFH を用いた FACS 解析により評価した。Tau およびリン酸化 Tau は，イムノブロット法により検出した。

【結果及び考察】

生理的濃度（1～10 nM）の Aβ42存在下で３日間以上培養すると，SK-N-SH 細胞および Neuro 2a 細胞の細胞死／アポトーシスが誘導され，細胞内 ROS レベル亢進を伴うことが確認された。この Aβ42誘導性細胞死／アポトーシスとそれに伴う ROS レベル亢進に対し，数百 nM の Cy3G は抑制的に作用した。一方，Neuro 2a MAPT 細胞を用いた結果から，1～10 nM Aβ42存在下でリン酸化 Tau レベルの亢進が確認され，これを Cy3G は抑制した。また，Cy3G は酸化ストレスから細胞を保護する転写因子 Nrf2 を活性化することが確認された。以上の結果は，Aβが酸化ストレスを与えて神経原線維変化および神経細胞死に導く説を部分的に支持し，これに対し，Cy3G はラジカル消去能だけでなく Nrf2活性化により抑制的に働くことが期待される。

本研究は，内閣府 SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発－14. 認知症予防効果の期待される米飯および米加工食品の開発」の一部として実施した。

1) S. Nakamura et al.:*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) .

cyanidin-3-glucoside, neuronal cell death, oxidative stress

講演番号：2B06p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟南 B06 会場

チョウザメおよびその含有成分の機能性

Functionality of components from Sturgeons farmed in Miyazaki

○神力 はるな[1]、永濵 清子[1]、服部 秀美[1]、黒木 勝久[1]、築地 加代子[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1]([1]宮崎大学、[2](株)宮崎活魚センター)
○Haruna KOURIKI[1], Kiyoko NAGAHAMA[1], Hidemi HATTORI[1], Katsuhisa KUROGI[1], Kayoko TSUKIJI[2], Masahito SUIKO[1], Yoichi SAKAKIBARA[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Miyazaki Katsugyo Center Co., Ltd)

【背景および目的】 チョウザメは一般的にキャビア生産を目的に養殖される。そのため約3年の養殖後にオスとメスが判別され、オスの魚肉は高級食材として出荷される一方で、約7～8年養殖後にキャビア採卵された後のメスの魚肉は、食材としての商品価値が低い。国内でキャビア生産を目的に養殖されているのは、シロチョウザメ、シベリアチョウザメ、ロシアチョウザメの三種類で、メス魚肉の有効活用が重要な課題になっている。チョウザメの魚肉は、イミダゾールジペプチドであるカルノシンを多く含むことが知られており、その有用性を活かした加工品の開発も期待できる。そこで我々は、チョウザメの魚肉のカルノシン含有量を調べるとともに、抗酸化作用などの機能性に関する研究を実施した。
【方法】 宮崎県内で養殖された各種チョウザメのオス（3年）、および採卵後のメス（6～8年）の魚肉を分析に供した。スープ用食材として加工したエキス粉末には、採卵後のメスシロチョウザメの内臓以外の部位（魚肉、アラ）を用いた。魚肉は、主に背なかの部分を切り出し、氷冷下でスルホサリチル酸を加えてホモジナイズ処理した後、脂質およびタンパク質を除去し、遠心分離およびフィルター処理した上清を分析に供した。分析は、イオンペアによる高速液体クロマトグラフィーおよび UF-Amino Station（島津製作所）を用いた。抗酸化ストレス作用は、抗酸化剤応答配列(ARE)をプロモーターに持つ OKD（Oxidative Stress Detector）を導入したマウス骨格筋由来の筋芽細胞株（C2C12）を用い、ルシフェラーゼ発光試験により評価した。C2C12(OKD)細胞は分化誘導培地として 2% ウマ血清を含む DMEM 培地で培養することで多核細胞(myotube)に分化させた。
【結果および考察】 カルノシン含有量を比較した結果、チョウザメの種により含有量に差がみられ、魚肉 100g あたり 200～450 mg と幅があった。採卵後のメスでは、シベリアチョウザメが魚肉 100 g あたり 200～300 mg であるのに対し、シロチョウザメは 300～450 mg と比較的多く含まれ、部位ごとの含有量にはあまり差が無いことが判明した。このことから、カルノシンなどイミダゾールジペプチドを含む加工食品への応用に十分利用価値があると思われた。さらに、骨格筋に至る分化誘導過程（分化誘導前、誘導後4日目、7日目）の細胞についてチョウザメエキス粉末の影響を上記レポーターアッセイ系により調べた結果、濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇し、骨格筋分化が進んだ細胞ほどその効果が高いことが明らかとなった。また、カルノシンのみではチョウザメの粉末ほどの効果は見られなかった。これらの結果から、チョウザメ粉末に含まれる何らかの成分が、Keap1/Nrf2 制御系に作用し、高い抗酸化酵素誘導作用を有する可能性が示唆された。

Sturgeon, Carnosine, antioxidant effect

発表責任者：榊原陽一（ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2B06p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B06 会場

栽培方法の異なるサトイモの成分分析と新規機能性の探索

Analysis of components and functions on Taro by different caltivation method

○山之内 博紀[1]、南 雄二[2]、加治屋 勝子[2] ([1]鹿児島大院農、[2]鹿児島大農)
○Hiroki YAMANOUCHI[1], Yuji MINAMI[2], Katsuko KAJIYA[2] ([1]Grad. Sch. Agri. Kagoshima Univ., [2]Kagoshima Univ.)

【目的】平成 27 年産野菜生産出荷統計(農林水産省)によると、サトイモの出荷量は宮崎県が全国第 1 位(全出荷量の 11.2%)、鹿児島県が第 4 位 (同 6.1%)であり南九州における重要な農産物であるが、病虫害の発生や種イモの不良により出荷量が変動する。サトイモの新規栽培法である湛水栽培は、水田に畝を作って種イモを植え、水を掛け流しながら育てる方法で、通常の畑地栽培と比較して病虫害の発生や障害イモの出現が減少するため、生産性の向上及びイモ個数の増加による収量の増大が期待されている。しかしながら、湛水栽培サトイモに含まれる成分や生体調節機能については調べられておらず、畑地栽培サトイモとの違いは解明されていない。そのため本研究では、栽培方法の異なるサトイモの成分分析をおこない、湛水栽培サトイモにおける新規機能性の探索を目的とした。
【方法】サトイモは、親芋・子芋・孫芋の生芋あるいは蒸芋の凍結乾燥粉末を調製し、親芋は必要に応じて部位ごとに分割したものを用いた。味認識装置を用いて蒸し芋の味の違いを部位別に数値化して評価した。成分分析では、えぐ味の原因物質とされる総シュウ酸量を HPLC で測定し、味との関係性を調べた。また、苦味の原因と考えられている硝酸態窒素も測定した。機能性探索では DPPH 法を用いて抗酸化活性試験を行い、農産物 100g あたりのトロロックス相当量にて評価した。さらに、サトイモの抗酸化活性に寄与する成分を推定するため、Folin-Ciocalteu 法を用いてポリフェノール含量を測定し、没食子酸当量として求めた。また、血管系細胞を用いて血管機能に対するサトイモの影響についても調べた。
【結果と考察】味認識装置による味の比較の結果、湛水栽培では、塩味・渋味刺激が低下した。水溶性シュウ酸及び不溶性シュウ酸塩はともに湛水栽培で減少し、前者においては親芋で渋味刺激との正の相関もみられた。このため従来法では親芋の食味性が悪く利用価値が低かったが、湛水栽培によりえぐ味が減少し、親芋の加工品への応用範囲が広がった。硝酸態窒素は苦味との正の相関がみられ、湛水栽培により親芋上部では減少したが、子芋・孫芋では大きな違いはなかった。抗酸化活性に関して、湛水栽培で抗酸化活性の有意な上昇がみられた。ポリフェノール含量も湛水栽培で増加し、抗酸化活性との高い正の相関がみられた。さらに、血管系細胞に対する機能性評価において、サトイモに含まれるレクチンが血球凝集活性を示したため、人工消化を実施したところ、血球凝集活性はみられなくなった。また、サトイモの水溶性抽出液に高血圧抑制効果が見られたため、現在、降圧作用のメカニズム解明に取り組んでいる。

Taro, antioxidant, polyphenol

発表責任者：加治屋 勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：2B06p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B06 会場

コマツナの品種・部位別ルテイン含量と SPAD 値（葉緑素量）との関係

Relationship between lutein content and SPAD value in Komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*)

○石本 太郎[1]、馬場 隆[2]、野田 誠司[1] ([1]東京都立食技セ、[2]東京都農総研)
○Taro ISHIMOTO[1], Takashi BABA[2], Seiji NODA[1] ([1]Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr., [2]Tokyo Metro. Agri. Forest. Res. Ctr.)

【背景】　コマツナ（*Brassica rapa var. perviridis*）は、クセが無く食べやすい風味と適度な歯ごたえが人気の野菜である。東京では古くから正月の雑煮や汁物の具などに用いられてきたが、品種開発や施設栽培の普及に伴ってほぼ一年中栽培されるようになり、利用場面が広がってきた。近年では生鮮野菜としてのみならずパン・麺・飲料など加工食品の原料としても利用されている。コマツナはカロテノイドの一種であるルテインを含有している。ルテインは目の疾患である加齢黄斑変性を予防する物質として注目されており、コマツナ加工時の挙動を把握し低減を抑制することは、コマツナの利用・消費拡大に繋がると考えられる。加工時の挙動把握に先立ち、コマツナ生葉のルテイン含量について、品種・葉長・部位等による差異と、SPAD 値（葉緑素量）との関係について検討したので報告する。
【方法】　東京都内で栽培されているコマツナ品種から葉色の異なる 5 品種を選択し、江戸川区のビニールハウスで栽培した。収穫後に最大葉長と葉身先端部の SPAD 値を測定し、葉身と葉柄を切り分けてルテイン含量を測定した。カロテノイドは HEAT 混液（ヘキサン:エタノール:アセトン:トルエン=10:7:6:7）を用いて抽出し、逆相 HPLC により測定した。
【結果・考察】　試験に供した 5 品種の全葉ルテイン含量は、最小が 2.9 mg/100 g FW、最大が 5.4 mg/100 g FW であった。同一サイズで品種間比較をした場合、全葉ルテイン含量は葉身 SPAD 値に対して正の相関を示した。このことから、葉身 SPAD 値は、高ルテイン品種探索の簡易な指標として利用できる可能性がある。一方、同一品種を「M サイズ（20 cm 以上 25 cm 未満）」から「＞L サイズ（30 cm 以上）」に生育させると、葉身 SPAD 値は上昇したものの、葉身ルテイン含量は上昇せず、全葉ルテイン含量は低下した。これは、生育に伴い、ルテイン含量の低い葉柄部が全葉に占める重量比が高まることによる。

komatsuna, lutein, age-related macular degeneration

発表責任者：石本太郎（taro-ishimoto@food-tokyo.jp）

講演番号：2B06p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B06 会場

発酵大豆イソフラボン素材の経口摂取による糖化ストレス抑制作用

Inhibitory effect on glycation stress following 16 weeks of fermented soybean isoflavones ingestion

○梅田 周佑、平松 直人、呉 暁紅、岡田 利孝 ((株)東洋発酵)
○Shusuke UMEDA, Naoto HIRAMATSU, Xiaohong WU, Toshitaka OKADA (TOYOHAKKO CO., LTD.)

【目的】近年、糖化によって生成される最終糖化産物 AGEs の生成・蓄積が生体機能の低下を引き起こし、その結果糖尿病やその合併症、骨質低下、シワ・タルミなど様々な疾患に関与することが明らかとなっている。この糖化による疾患を防ぐために、生体内の糖化反応を阻害し AGEs 生成の抑制、及び蓄積した AGEs の分解が重要であると考えられる。我々は食品及び化粧品に応用可能な抗糖化機能を有する素材の開発を目的として新規成分の探索を行った結果、大豆イソフラボンを主成分とする大豆エキスを黒麹で発酵させた発酵物（発酵大豆イソフラボン）に強い抗糖化作用があることを見出した。そこで、この発酵大豆イソフラボンの AGEs に対する影響を経口摂取により評価を行った。
【方法】総イソフラボン 10mg/日摂取となるよう、健康な成人男女 9 名(20～50 代、女性 : 6 名、男性 : 3 名)を被験者としてパイロット試験を実施した。血液中 CML、ペントシジン、皮膚 AGEs 蓄積量、角層中の CML を評価項目として、摂取開始から 16 週間まで 4 週間毎の各項目について評価を行った。
【結果】血液中の AGEs において、発酵大豆イソフラボンの摂取により血液中の CML、ペントシジン共に摂取 8 週目以降に有意に低下することが確認された。皮膚 AGEs において、皮膚 AGEs 蓄積量が摂取 8 週目以降、角層中の CML は 12 週目以降に有意に低下することが認められた。
【結論】以上の結果から、発酵大豆イソフラボンを経口摂取することにより、体内での糖化リスクの軽減が期待される。今後、健康維持及び美容を目的とした食品または化粧品への応用が望まれる。

anti-glycation activity, advanced glycation end products, isoflavone

発表責任者：梅田 周佑（shusuke_umeda@toyohakko.co.jp）

講演番号：2B06p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B06 会場

発酵大豆イソフラボンの最終糖化産物(AGEs)生成に対する影響

Inhibitory effect of soybean isoflavones fermented by Aspergillus saitoi on advanced glycation end products formation

○平松 直人、梅田 周佑、呉 暁紅、岡田 利孝 ((株)東洋発酵)
○Naoto HIRAMATSU, Shusuke UMEDA, Xiaohong WU, Toshitaka OKADA (TOYOHAKKO CO., LTD.)

【目的】近年、生体組織への AGEs の生成・蓄積が生体タンパク質の変性や機能低下を引き起こし、その結果糖尿病やその合併症、シワ・タルミなど様々な疾患に関与していることが明らかとなっている。従って糖化を防ぐためには、糖化反応を阻害し AGEs の生成を抑制したり、蓄積した AGEs を分解したりすることが重要であると考えられている。我々は食品及び化粧品に応用可能な抗糖化機能を有する素材の開発を目的として新規成分の探索を行った結果、大豆イソフラボンを主成分とした大豆エキスを黒麹で発酵させた発酵物（発酵大豆イソフラボン）に強い抗糖化作用があることを見出した。そこで、この発酵大豆イソフラボンの AGEs 生成に対する影響についての評価を行った。
【方法】モデルタンパク質とグルコースとの反応系において生じた蛍光性 AGEs 及び各種 AGEs に対する発酵大豆イソフラボンの生成阻害作用、また AGEs 架橋モデル物質を用いてのジカルボニル結合切断活性について評価した。
【結果】*in vitro* 反応系において、発酵大豆イソフラボンは濃度依存的に蛍光性 AGEs 及び各種 AGEs に対して生成抑制作用を示し、その活性は糖尿病合併症の治療薬として開発されたアミノグアニジンよりも高いことが示された。これら抗糖化作用を示す有効成分は、発酵過程おいて生成される ortho-Dihydroxyisoflavone であることが明らかとなった。AGEs 架橋切断作用においても、発酵大豆イソフラボンは濃度依存的にジカルボニル化合物の切断活性が高くなり、またその活性は AGEs 分解剤である PTB よりも高いことが示された。
【結論】発酵大豆イソフラボンは内外美容を目的とした新規食品及び化粧品原料として、単独での使用または美容食品との併用による美肌効果の増強が期待できる。

anti-glycation activity, advanced glycation end products, isoflavone

発表責任者：平松 直人（naoto_hiramatsu@toyohakko.co.jp）

講演番号：2B06p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B06 会場

Lactaldehyde 由来新奇メイラード反応後期段階生成物の同定
Identification of a Novel Advanced Glycation End Product derived from Lactaldehyde

○藤本 汐莉、村上 庸人、三宅 春奈、早瀬 文孝、渡辺 寛人 (明治大農)
○Shiori Fujimoto, Yoto Murakami, Haruna Miyake, Fumitaka Hayase, Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】還元糖などのカルボニル化合物によりタンパク質が修飾されて生成する糖化反応後期段階生成物（advanced glycation end products; AGE）は、受容体 RAGE との結合を介して細胞機能を障害し、さまざまな疾患の発症に関与する。生体内では多種多様な構造の AGE が生じうるが、とくにα-ヒドロキシアルデヒドとタンパク質 Lys 残基との反応により形成される 3-hydroxypyridinium 構造が RAGE を介した細胞毒性に重要であることをわれわれは見出している (1)。近年、ある種の代謝異常において、α-ヒドロキシアルデヒドである lactaldehyde が神経細胞に蓄積することが報告されている（2）が、その生理学的・病理学的意義については解析が行われていない。これら背景から本研究では、Lactaldehyde によるタンパク質 Lys 残基修飾構造の同定および生理作用の解析を行った。

【方法】N^{α}-acetyl-L-lysine(10mM)と lactaldehyde(20mM)を 200mM リン酸バッファー（pH 7.4）中で、37℃、4 日間反応させた。反応溶液を固相抽出（Sep-Pak C18）および逆相 HPLC(Inertsil ODS-4)に供し、主要化合物を精製して、その構造を LC-ESI-QTOF-MS および NMR により解析した。また、ラット神経細胞モデル PC12 に対するこの化合物の毒性を評価するとともに、RAGE との直接的相互作用について表面プラズモン共鳴法により解析した。

【結果】lactaldehyde と N^{α}-Acetyl-L-lysine の反応の主要生成物を単離し、LC-ESI-QTOF-MS 解析、NMR 解析に供することにより、3-hydroxypyridinium 構造を含むこの化合物の構造を同定した。また、この化合物を PC12 細胞へ作用させたところ、濃度依存的な細胞生存率の低下が観察された。さらに、Biacore システムを用いて解析を行ったところ、この化合物と RAGE の特異的相互作用が確認された。
以上より、lactaldehyde により Lys 残基が修飾されて形成される新奇 AGE は、RAGE を介して細胞毒性を発揮することが示唆された。

(1)村上ら　日本農芸化学会 2017 年度大会
(2)J.Morgenstern *et.al. J. Biol. Chem.* 292, 3224-3238 (2017)

lactaldehyde, glycation, RAGE

講演番号：2B06p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟南 B06 会場

ニホンナシ剪定枝抽出物のメラニン生成抑制作用と抗糖化作用
Melanogenesis inhibition and anti-glycation effects of Japanese pear tree pruned branch extract
○北舘 奏子[1]、高橋 麻子[1]、櫻井 望[2]、須田 邦裕[2]、滝田 潤[3]、大江 靖雄[1]、平井 静[1]、江頭 祐嘉合[1] ([1]千葉大院園芸、[2]かずさ DNA 研、[3]日東ベスト)
○Kanako Kitadate[1], Asako Takahashi[1], Nozomu Sakurai[2], Kunihiro Suda[2], Jun Takita[3], Yasuo Ohe[1], Shizuka Hirai[1], Yukari Egashira[1] ([1]Chiba Univ., [2]Kazusa DNA Res., [3]NittoBest Corporation.)

【目的】
皮膚の黒化はメラノサイト内のメラノソームで合成されるメラニンの産生によって引き起こされる。メラニン形成過程において、チロシナーゼが律速酵素として働いているため、チロシナーゼ阻害剤は美白化粧品への利用が可能である。例えばナシやコケモモといった植物から単離されたアルブチンは、チロシナーゼ活性阻害剤として広く美白化粧品に利用されている。
千葉県の代表的な農産物であるニホンナシは、その栽培の過程で枝の剪定が不可欠である。千葉県で発生する剪定枝総量は年間 1 万トンを超えると試算されているが、そのほとんどが廃棄処分されている。
ニホンナシ剪定枝から美白効果を有する成分を見出すことができれば、美白化粧品としてこうした未使用資源の活用が期待できる。そこで本研究では、ニホンナシの枝抽出物のメラニン生成抑制効果をはじめとした機能性の検討を行い、またその有効成分の特定を目指した。
【方法と結果】
メラニン生成能を有する B16 メラノーマ細胞にニホンナシ枝抽出物を添加して培養した後、細胞をチューブに回収した。そこに 1 N の NaOH を添加し 90 ℃で加熱することでメラニンを溶出させ、マイクロプレートリーダーを用いてメラニン生成量を測定した。また、培養後の細胞数を計測することで細胞生存率を算出した。これらの結果を、ナシ枝抽出物無添加群と比較し、メラニン生成抑制効果および細胞毒性を評価した。メラニン生成抑制試験の結果、ニホンナシ枝抽出物は濃度依存的にメラニン生成を抑制した。そこでニホンナシ枝抽出物を HPLC により分画したところ、細胞毒性を示すことなくメラニン生成を抑制するフラクションが見出され、その中に美白効果を有する成分が存在することが示唆された。メラニン生成抑制効果が認められたフラクションをさらに分画し、さらに機能性成分の絞り込みを行った。
また、ニホンナシ枝抽出物の抗酸化能および抗糖化能についても評価した。これらは肌の黒化やシミ、シワ・くすみの抑制に関与すると考えられている。その結果、ニホンナシ枝抽出物がこれらの機能性を有することが示唆された。
以上の結果から、ニホンナシ剪定枝抽出物が美白効果はじめとした機能性を有する化粧品に活用出来得る可能性が示された。

B16 melanoma cells, melanogenesis, anti-glycation

発表責任者：江頭　祐嘉合（egashira@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2B06p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟南 B06 会場

アルブミン-グリセルアルデヒド系を用いたフロロタンニン類の抗糖化活性の評価

Evaluation of anti-glycation activities of phlorotannins in human and bovine serum albumin-glyceraldehyde models

○谷口 凌佑[1,5]、杉浦 真悟[1,5]、田中 礼士[1,3,5]、三宅 英雄[1,3,5]、モリ テツシ[2,3,5]、植田 充美[4,5]、柴田 敏行[1,3,5]([1]三重大院生資、[2]東京農工大院工、[3]三重大海藻バイオ研、[4]京都大院農、[5]JST・CREST)
○Ryosuke Taniguchi[1,5], Shingo Sugiura[1,5], Reiji Tanaka[1,3,5], Hideo Miyake[1,3,5], Tetsushi Mori[2,3,5], Mitsuyoshi Ueda[4,5], Toshiyuki Shibata[1,3,5] ([1]Mie Univ. Grad. Sch. of Bio., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Tech. Grad. Sch. of Eng., [3]Mie Univ. Seaweed Res., [4]Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agri., [5]JST・CREST)

【目的】これまでの研究で，フロロタンニン類（フロログルシノール・オリゴマー）が，アルブミン-メチルグリオキサール（MG）反応系で，①Benzobisbenzofuran 構造を持つ化合物（Phlorofucofuroeckol A, Fucofuroeckol A）が優れた AGEs 生成阻害活性を持つこと，②Eckol が MG 捕捉活性を示すこと，をそれぞれ明らかにした[1)]。AGEs 生成経路の中で，糖代謝中間体のグリセルアルデヒド（GA）反応系から生じた AGEs は，強い細胞毒性を示すことが知られている。本研究では，アルブミン-GA 反応系を対象にフロロタンニン類の持つ抗糖化性を評価した。
【方法】アラメ属褐藻類（アラメ，サガラメ）とカジメ属褐藻類（カジメ，クロメ，ツルアラメ）の乾燥粉末を Folch 法に準じて抽出と分配を行い，フロロタンニン混合物を調製した。ケイ酸カラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を用いて，フロロタンニン混合物から Eckol（フロログルシノール三量体），Fucofuroeckol A（四量体），Phlorofucofuroeckol A（五量体），Dieckol（六量体）および 8,8′-Bieckol（六量体）を精製した。これらを実験サンプルとして，アルブミン（HSA，BSA）と GA との反応によって生じる AGEs の蛍光強度の測定から，フロロタンニン類の持つ AGEs 生成阻害活性を試験した。さらに，1,3-Cyclohexanedione を用いた誘導体化により，フロロタンニン類の GA 捕捉活性も測定した。
【結果】EC_{50} 値（μg/mL）の比較を行った結果，各藻体から得られたフロロタンニン混合物は，アラメが最も高い蛍光性 AGEs 生成阻害活性を持ち，ポジティブコントロールの塩酸アミノグアニジンと比較して HSA-GA 経路では約 2.3 倍，BSA-GA 経路では約 3.7 倍の値を示した。精製フロロタンニン類では，塩酸アミノグアニジンの EC_{50} 値（μM）より，Dieckol が HSA-GA 経路で約 18 倍，8,8′-Bieckol が BSA-GA 経路で約 27 倍の値をそれぞれ示した。フロロタンニン類の GA 捕捉率（%）は，フロロタンニン混合物，精製物共に塩酸アミノグアニジンの示す値より低かった。フロロタンニン類は，アルブミン-GA 反応系でも抗糖化性を示すが，その活性は AGEs 生成阻害活性に起因することが示唆された。

本研究は，科学技術振興機構・戦略的創造推進事業 CREST（研究領域：藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出）の支援を受けて行われた。

1) Sugiura S. *et al*. Nat. Prod. Commun., 12: 1793-1796 (2017).

phlorotannins, anti-glycation, AGEs

発表責任者：柴田 敏行（shibata@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2B07a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B07 会場

大豆全粒粉末からの大豆サポニン Bb の迅速精製法開発ならびに亜鉛トランスポーターZIP4 誘導活性の検証

A solubility-based separation of group B soyasaponins from whole soybean flour

○高橋 正和[1]、打田 慶明[1]、野場 翔太[1]、神戸 大朋[2]、片野 肇[1] ([1]福井県大生物資源、[2]京大院生命)
○ Masakazu TAKAHASHI[1], Yoshiaki UCHIDA[1], Shota NOBA[1], Taiho KAMBE[2], Hajime KATANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】亜鉛はタンパク質構成因子や酵素の補因子など多彩な役割を持つ必須金属元素であり，欠乏症には味覚障害や皮膚疾患などが知られている．これまでに我々は，腸管取込に必須な亜鉛トランスポーターZIP4 のタンパク質誘導活性を示す化合物として，大豆サポニン分子を大豆粗精製サポニン標品（サポニン含量：約 50%）から単離・同定している（*Biochem. J.*, **472**, 183-193 (2015)）．また大豆に含まれる主要サポニンの中でも大豆サポニン Bb は比較的高い比活性を示すことを確認している．しかし，カラム精製を主体とする従来精製法では長時間を要し，さらに回収率も低い．我々は大豆サポニン Bb について，水-有機混合溶媒への溶解度が大豆粗精製サポニン標品（サポニン含量：約 50%）に含まれる他の成分と顕著に異なることを見出し，同粗精製物から大豆サポニン Bb を迅速かつ高収率に精製する方法を構築してきた（*Anal. Sci.*, **31**, 85-89 (2015)）．本研究では，この溶解度分別法を利用し，大豆全粒粉末（サポニン含量：～0.4%）から活性大豆サポニンを得る迅速精製法の確立を検討した．
【方法】精製度の確認は，ODS カラムを用いた逆相 HPLC により行った．また ZIP4 誘導活性については，Hepa 細胞培養系を利用し，ZIP4 特異抗体を用いた Western blotting 法によって確認した．
【結果】100 g の大豆全粒粉末からメタノール抽出物（画分 1）を調製して逆相 HPLC 解析に供したところ，大豆サポニン Bb のピークが明瞭に確認された．この大豆サポニン Bb は水に難溶であるが，ホウ砂水溶液にはホウ酸エステルを生成して溶解し，さらに酸性溶液にすると，エステル加水分解により再沈殿する．この性質を利用して画分 1 を 20 mM ホウ砂水溶液と混合し，その遠心上清に塩酸を加え，生じた沈殿を遠心回収した（画分 2）．画分 2 を逆相 HPLC で解析したところ，主要ピークは大豆サポニン Bb を含め 4 本のみとなった．大豆サポニン Bb より溶出時間の遅い 3 つの低極性化合物を除くため，1-オクタノールで画分 2 を洗浄して 29 mg の沈殿画分（画分 3）を得た．この画分 3 を逆相 HPLC 解析に供したところ，大豆サポニン Bb 以外には顕著なピークはひとつだけであり，その実体は MS スペクトル(m/z = 767)からソヤサポニン Bc’と推定された．以上より，大豆全粒粉末（サポニン含量：～0.4%）から 3 工程で B グループの大豆サポニン Bb と Bc’を単離することに成功した．次に preparative 逆相 HPLC にて完全精製を行い，100 g の大豆から 5 mg の大豆サポニン Bb と 1 mg の大豆サポニン Bc’を得ることに成功した．またこれらの精製標品は，Hepa 細胞に対して ZIP4 発現増強活性を示すことが確認された．

soybean, saponin, zinc transporter

発表責任者：高橋正和（mastak@fpu.ac.jp）

講演番号：2B07a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B07 会場

固定化金属イオン親和力クロマトグラフィーにおけるカゼイン類の挙動
Behavior of casein digests in immobilized metal affinity chromatography
○鈴木 雅博（農研機構）
○Masahiro SUZUKI (NARO)

（背景）日本の国民健康・栄養調査によると食物繊維、ビタミンA、カリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛は摂取推奨量に達していない。不足している６栄養素の内、４栄養素がミネラルであることを考えると、日本人の栄養状況はミネラル摂取に問題が多いといえる。また、ミネラルは主に小腸で吸収されるが、小腸内は pH 8.3 の弱アルカリ条件であり亜鉛などは溶解度が低下してしまう。また、カルシウムも不溶性のリン酸塩を形成し、吸収率が低下することが知られている。カゼインホスホペプチド（CPP）はカルシウムイオンにキレートし、リン酸塩として不溶化することを阻害することによりカルシウムの吸収率を高めている可能性が強く示唆されている。これまでに、CPP 以外にもカルシウムとキレートし、カルシウム溶解度を高めているペプチドがいくつも見つかっている。近年、そのようなカルシウム溶解度を高めるペプチドの検索に、固定化金属イオン親和力クロマトグラフィー（Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC）が用いられるようになっている。
（目的）乳製品以外にもミネラル吸収を促進する食材を見出すため、IMAC は有効であると予想される。そこで、カゼインを人の有するプロテアーゼで処理していくと、IMAC での挙動がどう変化していくかを調査した。
（方法）プロテアーゼとしてペプシン、トリプシン、パンクレアチンを用いた。IMAC 用の樹脂としてエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を半分にしたような イミノ二酢酸基を有するキレート樹脂を用いた。IMAC 樹脂からペプチドを脱離させるには、酸性にする、リン酸やマグネシウムを流す等の方法が知られているが、今回はリン酸を流す方法をとった。CPP 類はリン酸基で結合するので酸性にして脱離させるには pH3 以下の強い酸性条件が必要である。また、マグネシウムで脱離すれば CPP 類のリン酸基にマグネシウムイオンが配位してしまうからである。
（結果）これまでのところ、CPP 類の分子が小さくなるほど IMAC 樹脂より脱離しにくくなる現象が確認されており、分子が大きいとリン酸基が分子表面に露出しにくくなるためと考えている。また、鉄(III) の結合力は強く、脱離には高濃度のリン酸が必要になる。それに対して、カルシウム(II) の結合力は弱く、カルシウム結合性ペプチドの検索に固定化カルシウム親和力クロマトグラフィーを使用するには注意が必要である。

mineral, affinity, chromatography

講演番号：2B07a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B07 会場

亜鉛欠乏が妊娠期母ラットおよび仔ラットの貧血指標に及ぼす影響

Influence of zinc deficiency on anemia index of pregnant mother and their litter in SD rats

○佐藤 采香[1]、後藤 知子[2]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大・院農、[2]宮城学院女子大・生活科学)
○Saika SATO[1], Tomoko GOTO[2], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Michio KOMAI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Miyagi Gakuin Women's Univ.)

【目的】

亜鉛（Zn）は多様な生理機能を持つ必須微量元素である。国民健康・栄養調査によると、ほとんどの世代で Zn 摂取量が少なく、ましてや妊娠期・授乳期には付加的摂取が必要だと考えると、潜在的に Zn 欠乏状態の若い女性が多くいると推定される。現在、実臨床において Zn 欠乏が貧血のリスクを高める可能性が示唆されているが、具体的なことはわかっていない。また近年、妊娠期の栄養状態が、生まれた子供の将来の病気発症リスクに関与する説が唱えられているが、貧血に関する詳しい報告はない。本研究では、低 Zn 食が母ラットおよびその仔ラットの貧血指標に及ぼす影響について解明することを目的とした。

【方法】

8 週齢 SD 系雌ラットに Zn 添加食（33.7mg/kg diet＝Suf）、または低 Zn 食（8mg/kg diet＝Low）を 3 週間給餌後、妊娠させ、出産まで各々同じ実験食を与えた（それぞれ Suf 群、Low 群）。その後、出生から離乳までの授乳期に、Suf 群母ラットに Zn 添加食を給餌した群（SS 群）、Low 群母ラットに Zn 添加食を給餌した群（LS 群）、Low 群母ラットに低 Zn 食を給餌した群（LL 群）の 3 群を設けた。離乳後は、全群の仔ラットに Zn 添加食を給餌し飼育した。毎週微量採血を行い、血漿中 Zn 濃度や、貧血指標となるヘマトクリット（Ht）値、赤血球数、血液塗抹標本による赤血球形態観察を行った。さらに、Zinc finger protein である GATA-1 の mRNA 発現量、亜鉛酵素である delta-aminolevulinic acid dehydratase タンパク質量等を測定した。

【結果】

Low 群母ラットにおいて、Ht 値が低 Zn 食を給餌した交配前の期間と、妊娠中の値で対照群よりも低い状況が観察された。また、Low 群母ラットの血液塗抹標本より菲薄赤血球が観察された。この時の血漿中鉄濃度に変化は見られず、妊娠期における潜在的な Zn 欠乏で貧血を発症する可能性が示唆された。また、雄の仔ラットにおいて、臓器重量は造血機能を持つ脾臓で LL 群が低い値となった。赤血球数は、LL 群と LS 群の平均値が SS 群よりも高い値となり、LL 群、LS 群での赤血球の増殖・分化が SS 群と異なっていることが予測された。妊娠期の亜鉛不足が造血系に何らかの影響を及ぼしているものと推測でき、なお詳細なメカニズム解明の研究を行っている。

この研究の一部は、一般財団法人糧食研究会の支援により行われた。

zinc, anemia, erythrocytes

発表責任者：駒井　三千夫（mkomai@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2B07a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B07 会場

鉄欠乏がラット小腸の抗酸化システムに及ぼす影響

The effect of iron deficiency on antioxidative system of rat small intestine

○小泉 真緩、芋岡 佑里奈、篠田 粧子（首都大院・人間健康科学研究科・栄養生化学）
○Mahiro Koizumi, Yurina Imooka, Shoko Shinoda (Tokyo Metropolitan Univ.)

【背景・目的】

鉄は生体にとって不可欠な微量元素であるが、過剰に取り込まれると酸化ストレスの発生に関与する。鉄欠乏時の小腸では鉄吸収が亢進するが、鉄貯蔵体のフェリチンは減少しているため、酸化ストレスを発生しやすい Labile iron pool (LIP) が増加する環境にある。そのため、鉄欠乏の生体は酸化ストレスに弱いと考えられている。一方、私たちは鉄欠乏時の十二指腸に鉄を投与すると、LIP が増加するにも関わらず、脂質過酸化の指標である TBARS が低く保たれることを見いだした。この時、粘膜細胞内のグルタチオン濃度が高く、鉄欠乏時に特有な粘膜防御システムの存在が示唆された。

そこで、鉄欠乏がフェントン反応に関連する抗酸化酵素の遺伝子発現および活性に及ぼす影響について調べた。また、PCR array によって、酸化ストレスに関連する 84 遺伝子の発現プロファイリングを行い、小腸各部位における抗酸化システムの特徴と鉄欠乏の影響について検討した。

【方法】

標準飼料（AIN-93G）または鉄無添加飼料で Wistar 系雄ラットを 3 週間飼育し、通常群及び鉄欠乏群とした。麻酔下で採血後、十二指腸（幽門直下から Treitz 靭帯まで）の粘膜を採取した（実験 1）。Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) の活性及び遺伝子発現、Glutathione (GSH)/Oxidized glutathione (GSSG) 濃度、Hydrogen peroxide (H_2O_2) 濃度を測定した。また実験 2 では、通常群及び鉄欠乏群の小腸を摘出し、3 等分（上部、中部、下部）し、上部のうち幽門直下から Treitz 靭帯までを十二指腸とした。小腸各部位から粘膜を採取して total RNA を抽出し、cDNA 合成した。RT² Profiler PCR array (Rat oxidative stress, Qiagen) に供し、遺伝子発現プロファイリングを実施した。

【結果】

鉄欠乏群の十二指腸粘膜では、通常群と比べて GSH 濃度が高く、H_2O_2 濃度が低かった。SOD 及び CAT 活性は鉄欠乏群で低かったが、遺伝子発現に有意な差はみられなかった。PCR array の結果から、階層型クラスタリングとヒートマップを作製した。小腸各部位における酸化ストレス関連遺伝子の発現には異なる傾向がみられ、鉄欠乏による遺伝子発現の変動も異なっていた。したがって、ラットの小腸では部位や鉄栄養状態により異なる抗酸化システムが働く可能性がある。

iron deficiency, antioxidative system, duodenum

講演番号：2B07a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B07 会場

体内鉄量の変化に応答する血液遺伝子の発現変化の解析
Analysis of whole blood gene expression changes that reflect iron status
○亀井 飛鳥[1]、篠崎 文夏[1]、安岡 顕人[1]、嶋田 耕育[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]([1]KISTEC、[2]東農大、[3]東大院農生科)
○Asuka KAMEI[1], Fumika SHINOZ[1], Akihito YASUOKA[1], Kousuke SHIMADA[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3] ([1]KISTEC, [2]Tokyo Univ. Agric., [3]The University of Tokyo)

【背景・目的】
鉄は、酸素の運搬体や酵素の補欠分子族などとしての役割を担う必須のミネラルである。出血や摂取不足などにより体内の鉄が不足すると、臓器中の貯蔵鉄が利用されて減少し、やがて貧血に至る。一方、体内の鉄過剰蓄積は酸化ストレスを引き起こす原因となる。鉄の過剰摂取研究の多くは通常の数十から数百倍量の鉄過剰摂取条件下にて実施されることが多かったが、我々は以前、日常的に起こり得る鉄過剰摂取条件を考慮し、通常食の 10 倍量の鉄をラットに与える実験を行った。その結果、肝臓および血液の遺伝子発現が顕著に変動すること、すなわち、肝臓や血液の遺伝子発現が体内の鉄量の変化に機敏に応答して変動する可能性を見出し報告した。特に血液の遺伝子発現変化については、体内鉄量の変化を捉えるための感度の高い指標となる可能性が考えられたため、鉄摂取量依存的に変動する遺伝子の抽出を試みることとした。
【方法】
3 週齢の雄性 SD ラットを予備飼育後、AIN93G 食を与える群（通常食群）、AIN93G 食に鉄を 2.5 倍、5 倍、10 倍量添加した食餌を与える群（鉄過剰食群）とに分け飼育した。飼育期間中は、食餌および水を自由摂取させた後、麻酔下で血液を採取し、血清中の生化学パラメータ測定および血液を対象とする網羅的遺伝子発現解析を行った。
【結果・考察】
飼育期間中の摂食量、体重増加に群間での差は認められなかった。また、肝臓中の貯蔵鉄量を測定したところ、鉄添加量依存的な増加が認められた。通常食群の鉄摂取量はラット成長において十分な量であることから、飼料への鉄添加量依存的な肝臓貯蔵鉄量増加は鉄不足を補った結果というよりも鉄の過剰蓄積の兆候であると考えらえた。続いて血液を対象とする網羅的な遺伝子発現解析を実施したところ、わずか 2.5 倍量添加群においても顕著な発現変動を示す遺伝子が抽出されるとともに、鉄摂取量依存的に変動する遺伝子群も見出された。これらの結果から、血液の遺伝子発現が鉄過剰食摂取に伴う体内鉄量の変化を早期より検出するための指標として有効である可能性が示された。
本研究の一部は、ロッテ財団奨励研究助成、JSPS 科研費 15H05346、総合科学技術・イノベーション会議のＳＩＰ（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

iron, blood, gene expression

講演番号：2B07a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B07 会場

New stable derivatives of the bifidogenic growth stimulator 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid

○Hiroshi KASAI, Yuya KAWASAKI, Kazuaki KAWAI (Univ Occup & Environ Health)

1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) is a bifidogenic growth stimulator isolated from a propionibacterium. As it is unstable under air, we have developed new stable DHNA derivatives, DHNA-4-sulfate (DHNAS) and DHNA-4-glucoside (DHNAg), which are supposed to be converted to DHNA in vivo. DHNAS was prepared by chemical synthesis. DHNAg was prepared by the biotransformation of DHNA in cultured tobacco cells (BY-2). These DHNA derivatives were stable at pH 3 and pH 7.4, and in water for up to 6 days, while DHNA decomposed rapidly in 20 hrs at room temperature. When DHNAS was administered to mice (n=6), no toxicity was detected, and softening of feces was observed. As a metabolite, DHNA-4-glucuronide (DHNAG) was detected in the urine. These observations suggested that DHNAS, DHNAg and DHNAG are useful food additives to stimulate the growth of bifidobacteria and improve the conditions of human intestines, leading to prevention of various diseases.

1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid, Bifidobacteria, Bifidogenic growth stimulator

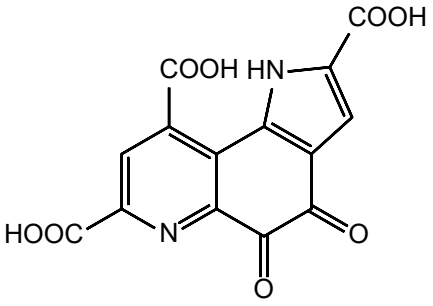
発表責任者：葛西宏（h-kasai@med.uoeh-u.ac.jp）

講演番号：2B07a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B07 会場

PQQ 誘導体化による寿命延長への影響
Lifetime extension of PQQ analogs
○池本 一人[1]、笹倉 寛之[2]、森 郁恵[2]([1]三菱ガス化学、[2]名古屋大)
○Kazuto IKEMOTO[1], Hiroyuki SASAKURA[2], Ikue MORI[2] ([1]MGC, [2]Nagoya Univ.)

１．序論

ピロロキノリンキノン(PQQ)はキノン構造を有するトリカルボン酸である。PQQ は脱水素酵素の活性部位としてキノン構造が酸化還元を行っている。このＰＱＱの二ナトリウム塩は脳機能改善、ミトコンドリア新生、抗酸化を有する機能性食品として使用されている。我々はこのＰＱＱが線虫（C. elegans）の寿命を 30%以上延長させることを確認し、PQQ が寿命を延長させるしくみを明らかにした[+]。PQQ は細胞膜上の活性酸素合成酵素を活性化している。この活性酸素が生体防御系のシグナルとして働いて長寿誘導が生じていることが分かっている。今回、我々は PQQ の誘導体を合成し、線虫を使った寿命試験を行った。



PQQ

２．実験方法

合成

ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩を出発物質として、エステル化、アルドール、加水分解、環化脱炭酸反応で 5 物質を合成した。

寿命試験

試験は線虫を対象とした。6cm シャーレに試験物質を 5mM 添加した寒天培地に餌となる大腸菌のコロニーを中心部に形成した。シクロナイズさせた線虫を 1 プレートあたり 10 匹で実験を開始した。プレート内の個体を毎日新しいプレートに移し替える。自発的な行動がみられず、振動刺激や接触刺激を与えても全く反応がみられなかった場合死亡とした。

３．結果

寿命試験の結果、エステル化体ではまったく寿命に影響しないもの、致死的に働く物質があった。また、アルドール反応物では PQQ と同様に高い寿命延長を示した。それぞれの物性と寿命延長効果の関連性を発表する。

４．参考文献*

H. Sasakura etal., J Cell Sci. 2017 Aug 1;130(15):2631-2643. doi: 10.1242/jcs.202119.

PQQ analog, logevity, C. elegans

発表責任者：池本一人（kazuto-ikemoto@mgc.co.jp）

講演番号：2B07a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B07 会場

ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩（ＰＱＱ）の認知機能評価

Effect of pyroloquinoline quinone (PQQ) disodium salt on cognitive function

○杉本 淳、池本 一人（三菱ガス化学)
○Atsushi SUGIMOTO, Kazuto IKEMOTO (MGC)

背景・目的

高齢化が進む現代において、脳の健康をサポートする食品は重要である。ピロロキノリンキノン（ＰＱＱ）は酸化還元酵素の補酵素として微生物より見出されたキノン化合物である。ピロロキノリンキノン二ナトリウムは食品として提供されている。これまでの臨床試験の結果、ＰＱＱが脳の認識能力の維持、改善に有効である。今回、ピロロキノリンキノン二ナトリウムを摂取した際にＭｏＣＡ軽度認知障害スクリーニング試験を行った結果を報告する。

試験方法

試験は 50 から 70 歳の重篤な疾患を有しない健常人 40 名を対象として二重盲検並行群間試験を実施した。各群の割付は、年齢、性差、試験食品摂取開始前の脳機能評価に基づくスコアが均一となるように行った。各群 20 名の被験者にピロロキノリンキノン二ナトリウム（三菱ガス化学株式会社製ＢｉｏＰＱＱ）を 20ｍｇ含有する食品または含有しないプラセボを 12 週間摂取させ、摂取開始前および摂取終了後に脳機能を評価した。

脳機能の評価には日本語版ＭｏＣＡ軽度認知障害スクリーニングを用いた。ＭｏＣＡは軽度認知機能低下のスクリーニングツールであり、多領域の認知機能（注意機能、集中力、実行機能、記憶、言語、視空間認知、概念的思考、計算、見当識）について評価することができる。群間の比較には、一人あたりのスコア変化量の平均を用いた。

結果

プラセボ摂取群の総合スコア変化量は＋０．６０点、ＰＱＱ摂取郡では＋１．３５点であった。このスコア変化量の差は統計的に有意傾向（０．０５＜ｐ＜０．１）を示した。さらに各認知機能の領域別スコアについて解析を行った。その結果、プラセボ摂取群の言語領域のスコア変化量が＋０．１５点であったのに対して、ＰＱＱ摂取群では＋０．６５点となった。このスコア変化の差は統計的に有意（ｐ＜０．０５）であった。これらの結果より、言語認識能力（文章の記憶）の維持、向上、改善にピロロキノリンキノン二ナトリウムの摂取が寄与すると考えられる。

本発表では、ＰＱＱによる脳機能改善効果について、これまでの臨床試験結果も合わせて紹介する。

PQQ, pyroloquinoline quinone, brain function

発表責任者：杉本淳（atsushi-sugimoto@mgc.co.jp）

講演番号：2B07a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B07 会場

赤血球と癌細胞におけるビタミン C 酸化体の細胞への取り込みの評価

Determination of cellular uptake of oxidized vitamin c in erythrocyte and cancer cells

○宮澤 大樹、松元 亮、合田 達郎、宮原 裕二（東京医科歯科大学）
○Taiki MIYAZAWA, Akira Matsumoto, Tatsuro Goda, Yuji Miyahara (Tokyo Medical and Dental University)

【背景・目的】疾病の予防や治療に、ビタミンをはじめとする有用な生理活性を持つ栄養成分を利用することへの関心が、今なお高まっている。ビタミンのなかでも、ビタミン C は生体内に高濃度で存在し、長年にわたりその生理作用が研究対象とされてきた。ビタミン C の中で最も広く認知されている形態は、アスコルビン酸（Ascorbic acid, ASC）であり、アミノ酸代謝の活性化、抗がん作用、コラーゲンの合成、細胞膜ビタミン E のリサイクル、シトクロム P450 の活性化、脂肪燃焼の活性化などの生理作用が多数報告されている。一方で、生体内には、ASC の他にデヒドロアスコルビン酸（Dehydroascorbic acid, DHAA）も存在する。In vitro や In vivo の研究環境において、ASC の一部は酸素や金属イオン等の共存下でこの DHAA に変換され、一定の濃度で存在している。近年、この DHAA が、ASC が持たない有用な生理作用を持つ物質である可能性が示唆され、にわかに注目を集めている。【1】この DHAA の生理作用をあきらかにするうえではその濃度や代謝挙動を理解することは重要である。今まで報告されてきた DHAA の分析では、アイソトープラベル化したものや、還元剤（ジチオトレイトール等）を用いて ASC と総ビタミン C 濃度の差を測定する方法が多く報告されているが、間接定量であったり、還元の条件の最適化が必要であったりするなど定量性に問題がある方法が広く使用されていた。そこで、本研究では UV-HPLC（高速液体クロマトグラフィー法）を用い、容易かつ直接定量的にこの DHAA を分析できる方法を開発しようとした。

【方法・結果】DHAA に UV 吸収が確認されるかどうかを検討するために紫外可視近赤外分光光度計でその吸収波長を確認した。そして、HPLC 条件を検討し、ASC、DHAA、そして抽出の際の安定物質であるメタリン酸の全てが分離される条件を検討した。さらに、DHAA の細胞取り込みを確認する方法として、過去にその取り込みが確認されているウサギ赤血球をモデルとして用いて【2】、DHAA の添加量依存的に細胞内に取り込まれたことを確認した。一方、ASC は 30 分のインキュベートではその取り込みは全く確認できなかった。また、グルコーストランスポーターを、その阻害剤であるサイトカラシン B（CytB）で阻害すると、その取り込みが阻害されたことを確認した。

【考察・結論】本研究で開発した分析法によって、DHAA を直接的に定量できることを確認した。しかしながら、分光光度計の結果のとおり、DHAA は ASC と比較して UV 吸収波長が低いため、mM レベルの実験では検出可能であるが臨床サンプル絵の応用が難しいことが予想され、より高性能な検出器などを今後検討する必要がある。

【1】Yun J et.al., Science, 350:1391-1396, 2015.【2】Fiorani M et.al., Arch Biochem Biophys, 334:357-361, 1996.

Vitamin C, HPLC, Glucose transporter

発表責任者：宮澤大樹（miyazawa.bsr@tmd.ac.jp）

講演番号：2B07a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B07 会場

葉酸受容体 FOLR3 の機能解析

Functional analysis of folate receptor 3

○中山 魁、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Kai NAKAYAMA, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【背景および目的】

葉酸は核酸合成やアミノ酸の代謝に関与している水溶性ビタミンの一種であり、心血管疾患や認知症のリスク因子であるホモシステインにメチル基を供与することによりメチオニンに代謝する役割を担っている。生体内には 3 種類の葉酸受容体（FOLR1、FOLR2、FOLR3）が存在することが知られており、FOLR1 ならびに FOLR2 は細胞膜上に存在し葉酸の細胞内への取り込みを担っている。一方、分泌タンパク質である FOLR3 の生体における役割は不明である。そこで本研究では、FOLR3 を過剰発現させた細胞を構築し FOLR3 の機能解析を行った。

【方法】

FOLR3 を過剰発現させた HEK293 細胞（FOLR3-HEK293）の構築を行い、培養上清中の FOLR3 をウェスタンブロット法により確認した。この過剰発現細胞を用いて、葉酸代謝拮抗阻害剤であるメトトレキサートおよびホモシステインの細胞増殖抑制作用における IC_{50} を算出した。また、分泌タンパク質としての FOLR3 の機能評価のため、FOLR3-HEK293 細胞の培養上清をヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y に添加し、ホモシステインの細胞毒性に対する影響を評価した。

【結果】

FOLR3-HEK293 細胞の培養上清中に FOLR3 が分泌されていることを確認した。葉酸含有培地では、空ベクターを導入した HEK293 細胞と比べ FOLR3-HEK293 細胞の細胞増殖が促進されたが、葉酸欠乏培地ではその作用は消失した。FOLR3-HEK293 細胞において、メトトレキサートによる細胞増殖抑制作用は増強されたのに対し、ホモシステインの細胞増殖抑制作用は減弱した。また、FOLR3-HEK293 細胞の培養上清を添加した SH-SY5Y 細胞ではホモシステインの毒性が低下した。

【結論】

FOLR3 は葉酸の細胞内への取り込みを増強することでホモシステイン代謝を促進する可能性が示された。

Folic acid, Folate receptor, Homocysteine

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B07a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B07 会場

ビタミン E を多く含む多収性飼料用米品種「オオナリ」を給与した豚肉の特性評価

Property evaluation of pork loin fed by rice (Oryza sativa L. cv. Oonari)

○木村 俊之[1]、中島 郁世[2]、山口 弘道[3]、草 佳那子[3]、斎藤 真二[4]、八日市屋 敏之[4]、佐々木 啓介[2]、小堀 真珠子[1]、宮澤 陽夫[5]、仲川 清隆[5]([1]農研機構食品研究部門、[2]農研機構畜産研究部門、[3]農研機構中央農業研究センター、[4]株式会社フリーデン、[5]東北大学大学院農学研究科)

○Toshiyuki KIMURA[1], Ikuyo NAKAJIMA[2], Hiromichi YAMAGUCHI[3], Kanako KUSA[3], Shinji SAITO[4], Toshiyuki YOUKAICHIYA[4], Keisuke SASAKI[2], Masuko KOBORI[1], Teruo MIYAZAWA[5], Kiyotaka NAKAGAWA[5] ([1]Food Research Institute, NARO, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [3]Central Region Agricultural Research Center, NARO, [4]Freden Co., Ltd., [5]Tohoku Univ.)

【目的】「オオナリ」は 2015 年に農研機構が育成したインド型多収の飼料用米品種であり、発表者らは「オオナリ」にビタミン E、とくにトコトリエノールが多いことを見出した。この「オオナリ」は多収性専用品種に指定され、その普及が期待されているが、畜肉に対する特性評価はされていない。そこで本発表では「オオナリ」を飼料として豚に給与した際の豚ロース肉の特性の評価を目的とした。
【方法】2016 年に群馬県みどり市にて栽培、収穫した「オオナリ」を乾燥籾として保管し、2017 年 7 月および 8 月に籾摺りした。生後 100 日（去勢）および 110 日（雌）の豚（三元交雑種）を 1 群 24 頭の 3 群に分け、飼料中のトウモロコシ（75%）に対し、各群「オオナリ」玄米を 0、 20、45%代替したエサで 8 月より約 2 か月間肥育した。屠畜後ロース部を冷蔵し屠畜 4 日後にロース部を切り分けた。胸最長筋を切り出し、スーパーでの販売形態を模して包装し、照明下 4℃条件下で屠畜 10 日後まで保存し、肉汁損失と肉色を評価した。また、成分分析用に屠畜 4 日後に切り分けたロース部を−80℃に冷凍保管した。
【結果】「オオナリ」は群馬県の現地圃場 2 か所において粗玄米収量 750. 8kg/10a および 850kg/10a となり、目標とした 700kg/10a を超え十分な収量が得られ、ビタミン E、特にトコトリエノールが多いことを確認した。飼養成績は平均 1 日増体重が「オオナリ」給与 20%群で 885g、45%群で 941g、飼料要求率は 20%群で 3. 22kg、45%群で 3. 10kg となり「オオナリ」の配合割合が多い方が良好であることがわかった。保存試験では、保存日数の経過に伴い肉汁損失が増加し、肉色は赤色度が増し、明度と黄色度が減少したが、「オオナリ」の配合割合による差は見られなかった。さらに豚肉の特性評価を進めるために、現在、ロース部を皮下脂肪、筋間脂肪、筋肉（胸最長筋）に分け、ビタミン E 量（トコフェロールおよびトコトリエノール）と脂肪酸組成を解析している。

tocotrienol, Oryza sativa L. cv. Oonari, pork loin

発表責任者：木村俊之（kmr@affrc.go.jp）

講演番号：2B07a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B07 会場

線虫のカルボニル化合物レベルに及ぼすビタミン B_{12} 欠乏の影響
Effect of vitamin B_{12} deficiency on carbonyls levels in *Caenorhabditis elegans*
○藪田 行哲、吉田 佳代子、美藤 友博、渡邉 文雄（鳥取大学農）
○Yukinori YABUTA, Kayoko YOSHIDA, Tomohiro BITO, Fumio WATANABE (Tottori Univ.)

【目的】ビタミン B_{12}（B_{12}）は主に動物性食品に含まれており、生体内では分岐鎖アミノ酸に代謝関わるメチルマロニル CoA ムターゼとメチオニン合成酵素の補酵素として機能している。我が国の推奨量は 2.4 μg/日とされており、極めて微量で有効である。しかしながら、中高齢者では胃酸分泌の低下や胃切除により B_{12} 吸収不全による B_{12} 欠乏症が多発している。B_{12} 欠乏によりメチルマロン酸尿症やホモシステイン血症の他、手足のしびれや痛みなどの神経障害や認知症が引き起こされる。しかしながら、神経障害や認知症の詳細な発症メカニズムは明らかではない。申請者らはこれまでに線虫を用いて B_{12} の機能について研究を行ってきた。その結果、線虫は哺乳動物と同様に生育に B_{12} を要求すること、短期間で B_{12} 欠乏線虫を調製できることを報告した（Bito et al., 2013）。最近その欠乏は酸化ストレスを惹起すること、そして非常に興味深いことに、B_{12} 欠乏は線虫の記憶能を著しく低下させることを発見した（Bito et al., 2017）。ところで、アルツハイマー病などの神経変性疾患の患者の脳内には脂肪酸の酸化物に由来するアクロレインや 4-ヒドロキシノネナル（HNE）などのカルボニル化合物が付加したタンパク質（カルボニル化タンパク質）が蓄積し、これらが神経細胞の損傷を増大させていると考えられている。以上より、B_{12} 欠乏の線虫では酸化ストレスに伴い、カルボニル化合物やカルボニル化タンパク質が蓄積しており、これらが記憶能の低下に関わっていると考え、ヒトの B_{12} 欠乏による認知症も同様のメカニズムにより引き起こされているのではないかと思われた。そこで B_{12} 欠乏が及ぼす線虫のアルデヒドレベルへの影響について解析した。
【方法】B_{12} 欠乏 M9 培地で 5 世代以上継代し、継代 3 日目の線虫を B_{12} 欠乏線虫とした。カルボニル化合物は 60℃に加温したアセトニトリルに線虫を 30 分浸漬して抽出し、ジニトロフェニルヒドラジンにより誘導体化した。また HNE を含む 24 種類のカルボニル化合物も同様にジニトロフェニルヒドラジン誘導体化し標準物質とした。分析は HPLC により行った。
【結果】HNE を含む幾つかのカルボニル化合物は B_{12} 欠乏線虫で増加していた。そこでさらに詳細に解析するために同調培養を行い、孵化 3 日後の線虫を用いて同様に解析した。その結果 HNE に加え 4-ヒドロキシヘキセナール、および *trans*-2-ペンテナールが B_{12} 欠乏線虫で増加していた。以上のことから B_{12} 欠乏により引き起こされた酸化ストレスにより脂質が酸化され、それによりカルボニル化合物が蓄積していると考えられた。

Caenorhabditis elegans, vitamin B_{12}, oxidative stress

発表責任者：藪田行哲（yabuta@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2B07a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B07 会場

ビタミン B_{12} 欠乏が線虫(*Caenorhabditis elegans*)の生殖及び産卵機能に及ぼす影響
Effects of Vitamin B_{12} Deficiency on Reproductive Function in *Caenorhabditis elegans*
○美藤 友博、岡本 奈穂、森脇 涼、北村 有子、藪田 行哲、河野 強、渡邉 文雄（鳥取大農）
○Tomohiro BITO, Naho OKAMOTO, Suzumi MORIWAKI, Yuko KITAMURA, Yukinori YABUTA, Tsuyoshi KAWANO, Fumio WATANABE (Tottori Univ.)

【目的】ビタミン B_{12} (B_{12}) はコリン環と称されるテトラピロール様骨格を有し、中心に存在するコバルト原子の上方にシアノ基、ヒドロキシ基、メチル基、5'-デオキシアデノシル基が配位する。その中でも、メチル基が配位する活性型のメチルコバラミンの大量投与は末梢性神経障害や男性不妊の治療薬として効果を有するが、それら詳細な薬理作用メカニズムは未解明な部分が存在する。また、B_{12} 欠乏哺乳動物では不妊症を発症することが報告されているが、B_{12} が生殖機能に及ぼす影響は不明である。これまでに、ヒトのモデル生物である線虫(*Caenorhabditis elegans*)にメチルコバラミンおよびシアノコバラミンの大量投与を行うと、線虫の総産卵数に影響は見られなかったが、短期間で産卵を終える産卵期間の短縮が認められ、B_{12} の大量投与は産卵機能を促進させることが明らかになった。そこで、本研究では B_{12} 欠乏が線虫の生殖機能に及ぼす影響を検討し、生殖機能における B_{12} の生理機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】コントロール線虫と B_{12} 欠乏線虫は、B_{12} 添加および B_{12} 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。線虫の生殖機能を評価するために、線虫が孵化してから産卵するまでの時間や総産卵数、また 1 日ごとの産卵数および孵化数を計測した。線虫の精子や卵子に特異的な遺伝子の発現、また、線虫の産卵機能に関与する遺伝子の発現を qPCR 法で評価した。
【結果】B_{12} 欠乏線虫の総産卵数はコントロール線虫と比較して、変化は見られなかった。しかし、1 日ごとの産卵数を比較すると、コントロール線虫は産卵開始 1 日目に最も多い産卵数を示すとともに 3 日間で産卵を終えるのに対し、B_{12} 欠乏線虫は産卵開始 2 日目に産卵数のピークを迎え、産卵期間が 5 日間であった。これらの結果から、B_{12} 欠乏は線虫の生殖機能または産卵機能を低下させることが示唆された。また、線虫の精子および卵子に特異的な遺伝子の発現を評価した結果、B_{12} 欠乏線虫とコントロール線虫で有意な変化を示さなかったことから、B_{12} 欠乏は精子数や卵子数に影響を及ぼさないことが推察された。現在は、線虫の産卵機能に関連する遺伝子の評価を行うとともに、産卵を促す神経伝達物質であるセロトニンに焦点を当て検討を進めている。

vitamin B_{12}, *Caenorhabditis elegans*, reproductive function

講演番号：2B07p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B07 会場

日本食はマウスにおいてストレス軽減効果を有する：メタボローム解析による新しい生理効果の探索
The Japanese diet has a stress reduction effect in mice: Search for physiological effects using metabolome analysis

○都築 毅、巫 啓明、鄂 爽、山本 和史（東北大院農）
○Tsuyoshi TSUDUKI, Qiming WU, Shuang E, Kazushi YAMAMOTO (Tohoku Univ.)

【目的】日本が長寿国になった要因の一つとして、日本食の影響が考えられている。これまでに、特徴的な成分については数多く研究されてきたが、日本食まるごとが健康状態に及ぼす影響について、科学的に検討した研究はほとんどなかった。以前我々は、現代日本食と現代米国食を比較し、現代日本食は現代米国食よりも健康有益性が高いことを明らかとした [1]。また、日本食はここ 50 年で欧米の影響を受けてその内容が大きく変化してきており、どの年代の日本食が健康維持に有益か分からなかった。そこで、1960 年、1975 年、1990 年、2005 年の日本食の健康有益性を比較するために、各年代の食事を凍結乾燥・粉末化しマウスに与えたところ、1975 年の日本食が最も内臓脂肪蓄積を抑制するなど高い健康有益性を示した [2-4]。本研究は、高い健康有益性を見出した 1975 年日本食の新たな生理効果を見出すことを目的として、メタボローム解析を用いた検討を行った。
【方法・結果】最初に、1975 年食の特徴を調べるために、様々な年代の日本食を与えたマウス血清を CE-TOFMS を用いたイオン性代謝物の分析と LC-TOFMS を用いた脂溶性代謝物の分析を合わせたメタボローム解析を行った。得られた結果に対して主成分分析を行ったところ、各年代の日本食を摂取した血清は成分的に大きな差異を有していた。第 1 主成分では年を追うごとに高値または低値を示している成分が抽出され、第 2 主成分では 1975 年食群を中心に高値または低値を示す成分が抽出された。1975 年食の機能に着目しているので、この第 2 主成分として抽出された成分を解析したところ、ストレス低減効果を持つ GABA を見出した。次に、1975 年食が実際にストレス軽減効果を有するかをマウスを用いて試験した。マウスには 1975 年食または普通食を 4 週間与え、その後拘束ストレスを与える群および与えない群に分けた。その結果、1975 年食を与えたマウスはストレス負荷時にストレスパラメーターであるコルチコステロンを有意に減少させた。
【結論】1975 年日本食の新規生理作用として、ストレス軽減効果が見出された。

[1] T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Food Sci, 61, 255-264 (2008).
[2] T. Honma, T. Tsuduki, et al., Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 60, 541-553 (2013).
[3] Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Sci, 2, 73-85 (2014).
[4] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 32, 122-128 (2016).

metabolome analysis, the Japanese diet, stress reduction effect

講演番号：2B07p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B07 会場

腸内細菌脂質代謝物（修飾脂肪酸）を用いて見出された、CCK 分泌を強く促進する脂肪酸の特異的構造

Specific structures of fatty acid which strongly promotes CCK secretion, found from gut microbial fatty acid metabolites

○小笠原 奨之[1]、矢萩 明日香[1]、比良 徹[1]、西村 紗希[2]、山下 貴稔[2]、原 博[1]（[1]北海道大院・農、[2]株式会社 J-オイルミルズ 基盤研究所）
○ Shono OGASAWARA[1], Asuka YAHAGI[1], Tohru HIRA[1], Saki NISHIMURA[2], Takatoshi YAMASHITA[2], Hiroshi HARA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Fundamental Research Laboratory, J-Oil Mills, Inc.)

【背景】消化管ホルモンの 1 つであるコレシストキニン（CCK）は、脂肪酸の刺激により小腸上部で分泌され、膵酵素分泌や食欲抑制を引き起こす。脂肪酸の鎖長が CCK 分泌活性に影響することは報告されている一方、CCK 分泌活性における脂肪酸の構造特異性については明らかではない。また近年、乳酸菌を利用して生産される様々な修飾脂肪酸（腸内細菌脂質代謝物）は、多様な生理作用を持つことが報告されているが、消化管ホルモンへの影響については知られていない。本研究は、リノール酸、α リノレン酸、γ リノレン酸由来の様々な構造の脂肪酸を用いて CCK 分泌活性を比較し、構造との関連性について調べた。
【方法】10%牛胎児血清を含む DMEM 培地で培養した、マウス小腸由来の CCK 産生細胞株 STC-1 を用いた。48 well プレートに細胞を播種し、約 48 時間培養して（37℃、5% CO2）、細胞密度を約 80～90%にした。培地を取り除き、HEPES バッファーで数回細胞を洗浄した後、各種脂肪酸 100 μM を含む同バッファーに、細胞を 1 時間曝露した（37℃、5% CO2）。上清を回収し、ELISA 法にて上清中 CCK 濃度を測定した。
【結果と考察】試験に供した脂肪酸の中で、リノール酸由来の 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC)、α リノレン酸由来の 13-oxo-cis-9-cis-15-octadecadienoic acid (13oxo)、10-oxo-trans-11-cis-15-octadecadienoic acid (αKetoC)、γ リノレン酸由来の 10-oxo-cis-6-cis-12-octadecadienoic acid (γKetoA)、10-oxo-cis-6-trans-11-octadecadienoic acid (γKetoC) に、高い CCK 分泌活性が確認された。また、これらの lactate dehydorogenase 放出を指標とした細胞傷害性は確認されなかった。
　これら 5 つの脂肪酸は、二重結合の隣にオキソ基がある構造、あるいは 2 つの二重結合の間にオキソ基がある構造のどちらか一方を有していた。以上より、高い CCK 分泌活性をもつ脂肪酸の新たな構造特異性が明らかとなった。

Cholecystokinin, Gut microbial fatty acid metabolites, Fatty acid

発表責任者：比良 徹（hira@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B07p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B07 会場

ダイゼイン腸内細菌代謝物エコールの雌特異的食欲低下効果の機構解明－雌雄ラットの腸肝循環エコール抱合代謝の比較－

Mechanism for equol-induced anorectic effect: sex differences in conjugated equol metabolism

○藤谷 美菜、阿部 恭大、小林 拓広、吉良 真結、岸田 太郎 (愛媛大院農)
○Mina Fujitani, Yasuhiro Abe, Takuhiro Kobayashi, Mayu Kira, Taro Kishida (Ehime Univ.)

【目的】我々は、大豆イソフラボン・ダイゼインが、雌ラット特異的に飼料摂取量を低下させることを見出した。この際、血中および胆汁中にはダイゼインよりもはるかに多く、その腸内細菌代謝物エコールが存在していた。さらに、エコールの混餌投与も雌特異的に飼料摂取量を低下させたことから、この効果はダイゼインではなくエコールによるものであることが示された。本研究で、ダイゼインおよびエコールを雌ラットに投与し、飼料摂取量とエコール体内分布の経日変化を調べた結果、腸肝循環エコールが作用の発現に重要であることが示唆された。ダイゼインおよびエコールは、肝臓や小腸で抱合体に代謝される。尿中ダイゼインは雄では主に硫酸抱合体であり、雌では主にグルクロン酸抱合体であることが報告されている。腸肝循環エコールの代謝にも雌雄差があるならば、それが雌特異的な作用の原因かもしれない。そこで、腸肝循環エコールの抱合型タイプを雌雄で比較することで、作用に重要なエコール抱合体の特定を試みた。

【方法】**試験 1:**7 週齢の SD 雌ラットに、コントロール飼料（AIN93G 組成、C 群)、ダイゼイン飼料またはエコール飼料（各々150 mg/kg 飼料、D150 群、E150 群）を与え、試験開始から 0.5、1.5、2.5、4.5 日後に、麻酔下で 30 分間胆汁を採取した後、採血した。尿と糞は、0.5 日後解剖群では試験開始時から解剖まで、その他の群では解剖直前 1 日間採取した。各々のサンプルについて HPLC－ECD 法でダイゼインおよびエコール濃度を測定した。**試験 2：**雌雄ラットを各々C 群、D150 群に分けた。試験試料を与えてから 18 日目に、麻酔下で胆汁を 90 分間採取した。胆汁中総および遊離型エコール濃度を HPLC－ECD 法で測定した。**試験 3:** 雌雄ラットを各々C 群または D150 群、D300 群 (300 mg/kg 飼料) に分けた。14 日後に胆汁を 1.5 ml 採取した。胆汁中エコールの抱合型タイプを LC-qTOF-MS/MS を用いて同定した。

【結果および考察】**試験 1:** 飼料摂取量は、C 群に比して E150 群で試験開始 2-3 日後、3-4 日後に有意に減少し、D150 群では 2-3 日後に減少傾向が見られた。D150 群と E150 群の胆汁中エコール濃度は 2.5 日間かけて上昇した。飼料摂取量と胆汁中エコール濃度に負の相関が見られた。エコールの腸肝循環プールの増加が飼料摂取量低下効果の発現に重要であることが示唆された。**試験 2:** 雌ラットの胆汁中の総エコール濃度、遊離型エコール濃度、および抱合型エコール濃度（総エコール濃度-遊離型エコール濃度）は雄のそれらに比して有意に高かった。いくつかの抱合型エコールは、雄に比べ雌で胆汁中濃度が高いと推測される。**試験 3:**各抱合型エコールの濃度は現在測定中である。

isoflavone, appetite, enterohepatic circulation

発表責任者：藤谷　美菜（fujitani.mina.uu@ehime-u.ac.jp）

講演番号：2B07p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B07 会場

腸―脳連関により抗うつ様作用を示す大豆ペプチド soy-deprestatin の作用機構

Mechanism of soy-deprestatin, an antidepressant-like peptide acting via the gut-brain communication

○朝倉 佐保、中戸 絢也、森 薫葉、金本 龍平、大日向 耕作（京大院・農・食品生物）
○Saho ASAKURA, Junya NAKATO, Yukiha MORI, Ryuhei KANAMOTO, Kousaku OHINATA (Kyoto Univ.)

【目的】現代のストレス社会を反映し、うつ病など精神疾患患者数は増加の一途を辿っており、新しい作用機構に基づく抗うつ様素材の開発が期待されている。最近、我々は主要な大豆貯蔵タンパク質β–コングリシニンの酵素消化により生成する 10 残基ペプチド soy-deprestatin（LSSTQAQQSY）が、抗うつ様作用を示すことを見出した[1]。本ペプチドは経口投与により医薬品に匹敵する低用量で抗うつ様作用を示す一方、腹腔内投与では作用が認められないことから、まず消化管に作用し、腸―脳軸を介して中枢にシグナルが伝達されている可能性が考えられる。そこで本研究では、本ペプチドの作用機構の解明を目的とし、抗うつ様作用に関与する各種受容体のリガンドを用いた検討、および構造―活性相関の検討を実施した。
【方法】実験動物は ddY 雄性マウスを用いた。抗うつ様作用は尾懸垂試験により評価し、無動時間が減少した場合に抗うつ様作用がありと判定した。
【結果および考察】Soy-deprestatin（0.3 mg/kg, p.o.）の尾懸垂試験における抗うつ様作用は、WAY100135、SCH23390、bicuculline（それぞれ、セロトニン 5-HT_{1A}、ドーパミン D_1、$GABA_A$ 受容体アンタゴニスト、i.p.）により阻害され、5-HT_{1A}、D_1、$GABA_A$ 受容体の活性化を介すると考えられた。また、5-HT_{1A} 受容体アゴニスト(8-OH-DPAT)の作用は D_1 および $GABA_A$ 受容体アンタゴニストによって阻害されたことから、5-HT_{1A} 受容体が最上流であることが明らかとなった。同様の検討を行った結果、3 つの受容体は 5-HT_{1A}→D_1→$GABA_A$ 受容体の順に活性化していると考えられた。さらに、5-HT_{1A} 受容体アゴニストは脳室内投与で抗うつ様作用を示す一方、経口投与では効果を示さないことから、消化管ではなく中枢の 5-HT_{1A} 受容体が抗うつ様作用に寄与することが判明した。また、soy-deprestatin の類縁体を化学合成し、構造―活性相関を検討した。その結果、N 末端側あるいは C 末端側への鎖長延長した多くの類縁体は活性を示さなかった。一方、N 末端と C 末端を1残基ずつ欠失した soy-deprestatin(2-9)が、抗うつ様作用を示すことを見出した。
【結論】Soy-deprestatin は、中枢に存在する 5-HT_{1A}→D_1→$GABA_A$ 経路を活性化し抗うつ様作用を示すことが示唆された。また、soy-deprestatin(2-9)が、抗うつ様作用を示すことを見出した。

[1] Mori Y, Asakura S et al., *FASEB J.*, in press.

brain-gut communication, peptide, antidepressant

発表責任者：朝倉佐保（asakura.saho.46s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B07p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B07 会場

牛乳由来ペプチドは高脂肪食摂取に伴う認知機能低下を改善する
Milk-derived peptide improves high fat diet-induced cognitive decline

○永井 研迅[1]、水重 貴文[2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1]([1]京大院・農・食品生物、[2]宇都宮大・農・応用生命)
○ Akitoshi NAGAI[1], Takafumi MIZUSHIGE[2], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

【目的】
超高齢社会を迎える我が国において認知症対策が急務である。糖尿病は、認知症の危険因子であることが判明し、脳機能が末梢環境の影響を強く受けることが示唆されている。一方、乳類摂取が認知症の防御因子であるという疫学調査結果も存在するが、詳細は不明である。これまで我々は、牛乳由来情動調節ペプチド Tyr-Leu-Gly（YLG）が、消化管を想定した酵素条件で生成することを見出した[1]。本研究では、高脂肪食負荷により低下する認知機能を牛乳ペプチド YLG が改善することを見出した。さらに、認知機能との関連性が指摘されている海馬神経新生に及ぼす影響について検討した。
【結果および考察】
雄性 ddY マウスを普通食および 60%高脂肪食で1週間飼育し、その間、YLG（10 mg/kg/day）を経口投与した。次に、認知機能の評価系として知られる 2 種類の行動試験を実施した。認知機能の一部であるエピソード記憶を評価する Object Recognition Test（ORT）を行ったところ、新規物体へのアプローチの割合が高脂肪食群において低下し、さらに、YLG 投与により上昇することが明らかとなった。したがって、YLG は高脂肪食負荷により低下したエピソード記憶を改善すると考えられる。また、空間記憶を評価する Object Location Test（OLT）を実施し、同様の傾向を示すことを見出した。YLG が空間記憶の低下を改善することが明らかとなった。さらに、臭化デオキシウリジン（BrdU)を用いて海馬神経新生を検討したところ、高脂肪食摂取により低下する BrdU 陽性細胞数が YLG 投与により改善することが明らかとなった。加えて、神経新生を促進する脳由来神経栄養因子（BDNF)の海馬における遺伝子発現量が YLG 投与により上昇することを見出した。
【結論】
短期間の高脂肪食負荷により海馬依存性記憶が低下し、この低下を牛乳ペプチド YLG が改善することを発見した。この改善には海馬神経新生の亢進、BDNF の発現上昇が寄与していると考えられる。

[1] Mizushige T, Sawashi Y, Yamada A, Kanamoto R, Ohinata K. FASEB J. 27(7):2911-7, 2013

Milk-derived peptide, Cognitive function, Neurogenesis

発表責任者：永井研迅（nagai.akitoshi.72z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B07p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B07 会場

無タンパク質食飼育マウスと老齢マウスに共通するグレリン感受性低下と視床下部遺伝子発現変化
Decreases in ghrelin sensitivity and changes in hypothalamic gene expression observed in young mice fed protein-free diet and aged mic
○竹隈 幸洋、井口 慎、中戸 絢也、金本 龍平、大日向 耕作（京大院農食品生物）
○ Yukihiro TAKEKUMA, Shin IGUCHI, Junya NAKATO, Ryuhei KANAMATO, Kousaku OHINATA (Kyoto Univ.)

【目的】高齢者における食欲不振はフレイルやサルコペニアの原因となることから、その対策が期待されている。しかしながら、加齢による摂食量低下（Physiological anorexia of aging）の詳細は不明な点が多い。これまで我々は、老齢マウスでは、末梢投与で有効な内因性摂食促進ホルモンであるグレリンの反応性が低下することを報告した[1]。さらに本研究では、若齢マウスを無タンパク食飼育することにより、老齢マウスと同様に、グレリン感受性が低下することを見出した。また、食欲調節に重要な脳の視床下部領域の遺伝子発現を検討し、無タンパク食飼育による摂食調節異常の実体解明を目指した。加えて、無タンパク質飼育と老齢マウスの遺伝子発現プロファイルを比較した。
【結果および考察】雄性 C57BL/6N マウスにタンパク質含量の異なる試験食で 1 週間飼育した。グレリン投与（0.3mg/kg, i.p.）により、普通食（タンパク質 20%）群では摂食量が増加し摂食促進作用が認められる一方、無タンパク食群では摂食量は増加しなかった。さらに、無タンパク質群の血中グレリン濃度は、普通食群と比較し有意な増加が認められた。したがって、短期間の無タンパク摂取により、グレリン感受性が低下していることが明らかとなった。次に、視床下部の遺伝子発現を検討したところ、強力な摂食促進ペプチドであるニューロペプチド Y（NPY）およびアグーチ関連ペプチド（AgRP）の mRNA 発現量が無タンパク質群において増加し、NPY/AgRP の下流シグナルに障害が起こっていると考えられた。グレリン感受性低下や視床下部 NPY/AgRP 発現増加は、老齢マウスにおいても観察される[1]。老齢マウス（２７ヶ月齢）において変動する視床下部 mRNA をマイクロアレイ法により包括的に分析したところ、老齢マウスにおいて発現が減少する摂食促進因子 Neuron-derived neurotrophic factor（NDNF）が、無タンパク質食群においても減少することを新たに見出した。老齢マウスと無タンパク質食飼育マウスの遺伝子発現プロファイルが類似し老齢マウスにおいてタンパク質欠乏に類似した状態に陥っている可能性も否定できない。
【結論】若齢マウスの無タンパク質飼育によりグレリンの感受性が低下することが明らかになった。また、視床下部において摂食促進シグナルが亢進し、これは老齢マウスと共通していた。

protein-free, Ghrelin, hypothalamic neuropeptides

発表責任者：大日向耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B07p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B07 会場

α-シヌクレイン過剰発現酵母株を用いた神経変性疾患に有効な物質の探索

Isolation and identification of substances for neurodegenerative diseases using α-synuclein overexpressed yeast strain.

○井上 奈々[1]、渡辺 大輔[2]、上杉 祥太[1]、大野 美紗[1]、高木 博史[2]、木村 賢一[1]([1]岩手大学農学部、[2]奈良先端科学技術大学院大学)
○ Nana Inoue[1], Daisuke Watanabe[2], Shota Uesugi[1], Misa Ohno[1], Hiroshi Takagi[2], Ken-ichi Kimura[1] ([1]Fac.of.Agri.,Iwate Univ, [2]Grad.Sch.of Biol.Sci.,NAIST)

【目的】パーキンソン病やレビー小体型認知症などの神経変性疾患は、発病の機構が未だ明らかでなく、そのため使用されている医薬品も限られている。その原因の一つとして、α-シヌクレインという 140 アミノ酸残基から成る脳内脂質結合タンパク質がその発病に関与している可能性が示唆されている[1)]。また、α-シヌクレインはユビキチンープロテアソーム系で分解されることも知られている[2)]。一方、高木らは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のユビキチンリガーゼ Rsp5 の変異株（*rsp5*^{A401E} 株）[3)]で、α-シヌクレインを過剰発現させると野生型株に比べて生育が著しく阻害されることを報告している[4)]。そこで本研究では、α-シヌクレインを過剰発現させた *rsp5*^{A401E} 株の生育回復活性（病気の予防や治療活性）を指標とするスクリーニング系を確立し、パーキンソン病やレビー小体型認知症の予防や治療に有効な生物活性物質を天然資源から探索することを目的とした。
【方法】α-シヌクレインを過剰発現させた *rsp5*^{A401E} 株をスクリーニング系に利用するため、培地、菌数、並びにストレス誘導条件の検討を行った。作製した寒天培地に、天然資源のメタノール抽出サンプルを 20 μg スポット後、28℃で 3 日間培養して生育回復活性を観察した。活性を示した天然資源に含まれる活性物質の性質は、熱安定性（100℃、10 分）、溶媒移行性（酢酸エチルとブタノール）で調べ、最終的に HPLC で分析した。
【結果・考察】スクリーニング条件は、SCG 培地（2% Galactose、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acid、0.077% DO amino powder without Uracil）に、8 x 10^5 cells/ml の菌を塗布した寒天培地を用いた。研究室保有の食材、植物、海藻類など約 1,100 サンプルを用いてスクリーニングを行ったところ、阻止円活性（毒性）は認められず、生育回復活性のみを示した 10 種のサンプルを得ることができた。それらは全て果物類で、活性の強い順に、パイナップル＞サクランボ＝グミの実＝サルナシ＞キウイフルーツ＞ブルーベリー＝ヤマボウシ＝プルーン＞ベニナツメ＞キンカン、であり、身近に食されている食材であった。それらの活性物質の性質は、熱に安定な水溶性物質の性質を示したことから、現在、逆相 HPLC での分析を進めている。

1) J. Q. Trojanowski, *et al*., Arch Neurol, **55**, 151-152 (1998)
2) S. E. Davies, *et al*., Neurobiol. Dis., **64**, 79-87 (2014)
3) C. Hoshikawa, *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, **100**, 11505-11510 (2003)
4) I. Wijayanti, *et al.*, J. Biochem., **157**, 251-260 (2015)

Saccharomyces cerevisiae, rsp5A401E, α-synuclein

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2B07p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B07 会場

焙煎度の異なる棒ほうじ茶の香気が脳機能に与える影響

The effect of odor of roasted stem tea on brain function

○小長井 ちづる[1]、藤原 美佐子[2]、笹木 哲也[3]、丸谷 誠慶[4]、道畠 俊英[3] ([1]十文字学園女大・健康栄養、[2](株)クレッシー、[3]石川県工業試験場・化学食品部、[4](株)丸八製茶場)
○Chizuru KONAGAI[1], Misako FUJIWARA[2], Tetsuya SASAKI[3], Masachika MARUYA[4], Toshihide MICHIHATA[3] ([1]Jumonji Univ., [2]CRESCI Co.,Ltd., [3]Industrial Research Institute of Ishikawa, [4]Maruhachi Seichajo Co., Ltd.)

【目的】棒ほうじ茶は、チャノキ（*Camellia sinensis*）より得られる茎を焙煎したものであり、香ばしい香気を有することを特徴とする。本研究は、棒ほうじ茶の焙煎度の違いによって、その香気が脳機能に与える影響の差異を、脳波解析によって非侵襲的に検討することを目的とした。さらに、試料の香気成分の分析を行い、脳機能に与える影響との関係につき検討した。
【方法】脳波測定試験は、19.5±1.9 歳の右手利き健康女性 14 名を対象として実施した。ヘルシンキ宣言に基づき、被験者には事前に書面及び口頭により研究の主旨や方法について充分に説明を行ない、インフォームド・コンセントを得た。試料は、焙煎度の異なる棒ほうじ茶（未焙煎、弱焙煎、中焙煎、強焙煎）抽出液および 98℃の蒸留水（無臭対照）とした。脳波は、国際 10-20 法に従い頭皮上 19 部位より連結両耳朶を基準として測定した。各試料を、被験者の鼻下 5cm の位置にランダム順に呈示し、その直後より閉眼座位状態の脳波を 3 分間導出記録し、FFT 解析によりα1（8.0～9.9Hz）およびα2（10.0～13.0Hz）帯域のパワー値を求めた。各試料の脳波測定直後には、VAS による主観的評価ならびに唾液アミラーゼ活性の測定を行った。また、試料の香気成分は、ヘッドスペース部の香気成分を SPME ファイバーに吸着させたのち、ガスクロマトグラフ質量分析計により分析した。なお、本研究は新渡戸文化短期大学倫理委員会の承認を得て実施した。
【結果および考察】脳波測定の結果、α2 帯域のパワー値について、右頭頂部において試料間に有意な差がみられ（p=0.016）、強焙煎の棒ほうじ茶の香りを嗅いだ際には低焙煎の場合に比し有意にα波パワー値が低く（p=0.010）、また中焙煎に比べても小さい傾向がみられた。右後頭部においても試料間に差のある傾向がみられ、弱焙煎では強焙煎に比しパワー値が大きい傾向にあった。以上の結果から、焙煎度の強い棒ほうじ茶については、焙煎度の弱い棒ほうじ茶や中焙煎の棒ほうじ茶に比べてα波量が減少することが明らかとなった。このことは、棒ほうじ茶の香気は比較的焙煎度の弱いものの方が脳機能を安定化させる効果が高く、焙煎度を強くしすぎることにより、その効果が低下することを示している。α2 帯域の脳波は、心理的にはリラクセーションの度合いを反映するとされることから、棒ほうじ茶の香気は焙煎度が弱いほどリラクセーション効果が高いことが推測された。さらに、試料の香気成分を分析した結果、弱焙煎の棒ほうじ茶では Indole、Dimethyl sulfide 等が、強焙煎の棒ほうじ茶では Methyl salicyate、1-ethylpyrrole 、Furfurylpyrrole 等が多く検出され、これらの成分が脳機能の安定化ないし安定度の低下に影響を与える可能性が示唆された。

roasted stem tea, odor, electroencephalography

発表責任者：小長井ちづる（konagai@jumonji-u.ac.jp）

講演番号：2B07p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B07 会場

消化管による cinnamtannin A2 の認識機構の探索
Searching of recognition mechanism of cinnnamtannin A2 by sensory nerve in GUT
○羽里 直幹[1]、黒木 麻由[1]、難波 文男[2]、戸田 登志也[2]、安達 貴弘[3]、越阪部 奈緒美[1]([1]芝工大 生命、[2]フジッコ株式会社、[3]東京医科歯科大)
○Naoki HAZATO[1], Mayu KUROGI[1], Fumio NANBA[2], Toshiya TODA[2], Takahiro ADACHI[3], Naomi OSAKABE[1] ([1]Shibaura Institute of Tech., [2]Fujicco Co., Ltd., [3]Tokyo Med Dent Univ.)

Flavan 3-ols を豊富に含む食品を摂取することで、メタボリックシンドロームのリスクファクターが改善されることが報告されている。しかし、flavan 3-ols の生体利用性は極めて低いため、作用メカニズムは未だ解明されていない。近年、唐辛子に含まれる capsaicin や allyl isothiocyanate などの食品因子吸収プロセスを経ずに消化管知覚神経を介して中枢へと働きかけ、交感神経を刺激しエネルギー代謝を亢進することが報告されている。我々はこれまでに、正常動物でみられる flavan 3-ols 単回投与による血圧の一過的な上昇 [1]、エネルギー代謝亢進作用 [2]が、知覚神経除去モデルラットで消失することを確認している。また知覚神経除去ラットの脊髄後根神経節(DRG)のトランスクリプトーム解析では膜貫通型タンパクコード遺伝子のうちカルシウムチャネルの発現量が顕著に低下することを確認している。これらのことから flavan 3-ols 投与後の生理学的変化には、消化管知覚神経の関与が示唆された。そこで本研究では flavan 3-ols の構成成分のうち交感神経作用の強い epicatechin 四量体である cinnamtannin A2 を投与することで逆行性神経トレーサーである Fluoro Gold（FG）に標識される DRG 上のポリフェノール応答性神経細胞を検出し、cinnamtannin A2 の消化管における認識機構の解明を進めることにした。実験動物として Wistar 系雄性ラット 10 週齢を用い、麻酔下で開腹し、胃の噴門、幽門、胃体部に FG 溶液を投与した。翌日から溶媒、capsaicin、cinnamtannin A2 の反復投与を 3 日間行った。投与 3 日目に左心室から灌流固定を行い、DRG の T1-T13 を摘出し、8 μm のパラフィン切片を作成した。切片を蛍光顕微鏡にて観察を行い、全細胞数、FG 標識細胞数の計測を行い、存在比率を算出した。その結果、摘出した各 DRG において溶媒投与群である対照群と capsaicin 群または cinnamtannin A2 群を比較したところ、FG 標識細胞数に差異は認められなかった。また消化管に対応する DRG である T8－T12 における標識細胞総数を対照群と比較したところ、capsaicin 群および cinnamtannin A2 群で FG 標識細胞数が有意に増加した。このことから flavan 3-ols の構成成分である cinnamtannin A2 は capsaicin と同様に消化管知覚神経に存在する標的分子によって認識される可能性が示唆された。今後は DRG における神経活動マーカーである c-fos 及び共発現する受容体の mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて観察することで、消化管による cinnamtannin A2 の認識機構の解明を進める。

1）Saito et al. Free Rad Biol Med 2016
2）Kamio et al. Free Rad Biol Med 2016

cinnamtannin A2, DRG, Brain-GUT axis

発表責任者：越阪部奈緒美（nao-osa@sic.shibaura-it.ac.jp）

講演番号：2B07p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B07 会場

エネルギー代謝改善を介したロスマリン酸の認知機能低下に対する効果

The effects of Rosmarinic acid on cognitive decline via energy metabolism improvement.

○山下 玲[1]、長谷 知輝[1]、浜口 毅[2]、篠原 もえ子[2]、山田 正仁[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]金沢大院・医・医、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Rei YAMASHITA[1], Tomoki HASE[1], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Moeko SHINOHARA[2], Masahito YAMADA[2], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ., [3]KISTEC)

【背景・目的】
疫学調査により食品ポリフェノールを摂取する食習慣がアルツハイマー病（AD）予防に繋がることが報告されているが、科学的証拠は得られていない。我々は *in vitro* 及び *in vivo* の系において、シソやローズマリーに含まれるロスマリン酸（RA）が AD の主病態とされるアミロイド β タンパク質（Aβ）の凝集抑制効果を示すことを見出した。本研究では、RA の抗 AD 効果について行動表現型・遺伝子発現パターンの両面から検証するとともに、RA の抗 AD 機作を解明することを目的とした。
【方法】
3 ヶ月齢雌性 Tg2576 マウス及び野生型（WT）マウス（C57BL/6J マウス）をそれぞれ、AIN-93G を基本飼料としたコントロール群（Cont 群）、 0.5% RA 含有 AIN-93G を与えた RA 群の 2 群に分け、12 か月間飼育した。飼育後、オープンフィールド試験及び新奇物体認識試験による認知行動試験を行った。また、免疫組織染色による脳内 Aβ 蓄積の観察により AD 進行度を確認した。更に脳、腓腹筋及び肝臓の DNA マイクロアレイ解析により、RA の作用機序の解明を試みた。WT マウスに関しては同様の飼育を 2 回行い、脂肪量および活動時・安静時の消費エネルギー測定を行った。
【結果・考察】
新奇物体認識試験では、Tg-Cont 群で記憶および認知機能の低下がみられ、Tg-RA 群では記憶や認知機能が WT-Cont および WT-RA 群と同程度のレベルまで改善されていることが明らかとなった。記憶と関連が深い海馬の DNA マイクロアレイ解析の結果、Tg-RA 群では、Tg-Cont 群と比較し、グルタミン酸および GABA などのシグナル伝達に改善が見られ、これらの機構を介して認知機能が改善された可能性が示唆された。一方 WT マウスにおいては、RA 群で体重増加抑制及び脂肪量、体脂肪率の減少が観察され、消費エネルギーは活動時・安静時共に増加した。更に肝臓の DNA マイクロアレイ解析では、アセチル CoA の β 酸化亢進、およびⅡ型糖尿病の抑制が示唆されたことから、RA にはエネルギー代謝亢進効果及び抗糖尿病効果がある可能性が考えられた。肥満や糖尿病は AD との相関が指摘されていることから、我々は RA の AD 予防効果の 1 つの機作として、肥満および糖尿病の予防を介する経路を考え、各臓器の遺伝子発現変動を比較し詳細な機序の解明を進めている。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Rosmarinic acid, Alzheimer dementia, Energy metabolism

講演番号：2B07p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B07 会場

ロスマリン酸による脳内モノアミン類変動の解析
Analysis of the change of monoamine in brain by rosmarinic acid
○長谷 知輝[1]、山下 玲[1]、宍戸 駿[1]、豊田 集[2]、平 修[3]、浜口 毅[4]、篠原 もえ子[4]、山田 正仁[4]、阿部 啓子[1,2]、小林 彰子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川県立産業技術総合研究所、[3]福井県大・生物資源、[4]金沢大医)
○Tomoki HASE[1], Rei YAMASHITA[1], Shun SHISHIDO[1], Tsudoi TOYODA[2], Shu TAIRA[3], Tsuyoshi HAMAGUCHI[4], Moeko SHINOHARA[4], Masahito YAMADA[4], Keiko ABE[1,2], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KISTEC, [3]Fukui Prefectural Univ., [4]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】
我々のグループは、アルツハイマー病(AD)の主病態である脳内アミロイド β(Aβ) の沈着を抑制するポリフェノールとして、独自にロスマリン酸(RA)を見出した。AD モデルマウスを用いた *in vivo* 試験において RA は経口摂取により Aβ 凝集が抑制されたが、RA は腸管吸収性が低く、経口摂取した 1%と見積もられている(Konishi et al., *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005)。さらに、血液脳関門の存在により脳内へはごく微量しか移行しないことも考えられた。当研究室で行った DNA マイクロアレイ解析では、遺伝子発現変化において RA 群の脳内で Aβ 凝集抑制活性が報告されているモノアミン類濃度の上昇が示唆された。そこで本研究では、RA による Aβ 凝集抑制効果として脳内モノアミン濃度の上昇に着目し、RA 経口摂取時の脳内モノアミン類変動およびそのメカニズムを詳細に解析することを目的とした。
【方法・結果】
野生型マウスである C57BL/6J マウスを、AIN93G を与えるコントロール(C)群(n=5)、AIN93G に 0.5%ロスマリン酸を混合したロスマリン酸(RA)群(n=6)に分けて 11 日間飼育した。飼育完了後に脳を大脳皮質、海馬、線条体に分けて採取し、部位ごとにモノアミン類の濃度を高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器(HPLC-ECD)で測定した。その結果、大脳皮質において特定のモノアミン類の量が有意に増加していたことから、RA 摂食による脳内モノアミン類合成・代謝経路の活性化が示唆された。また、同様に飼育した野生型マウスにおいて、左脳 sagital 面のイメージング質量測定を行った結果、同モノアミン量が RA 群の大脳皮質および線条体において増加していた。
次に同系統の野生型マウスを C 群(n=5)、RA 群(n=6)に分けて同期間飼育し、黒質・腹側被蓋野におけるモノアミン類代謝酵素の mRNA 発現量を RT-PCR 法により測定した。その結果、RA 群においてモノアミン類分解酵素の mRNA 発現量が有意に低下していた。これらのモノアミン類は、Aβ に直接作用してその凝集を抑制することが報告されており、RA 摂食に伴うこれらのモノアミン類分解酵素の発現低下が Aβ の凝集抑制に寄与する可能性が示され、AD の治療ターゲットとなりうると考えられた。
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Alzheimer disease, Monoamine, Rosmarinic acid

講演番号：2B07p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B07 会場

ロスマリン酸の抗アルツハイマー作用に関する検証
The research regarding the effects of Rosmarinic acid on Alzheimer disease
○山本 宗[1]、篠原 もえ子[2]、浜口 毅[2]、山田 正仁[2]、小林 彰子[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]金沢大院・医・医)
○So YAMAMOTO[1], Moeko SHINOHARA[2], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Masahito YAMADA[2], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】
アルツハイマー病（AD）の罹患者数は増加の一途を辿っているが、未だ根本治療薬は存在せず、食品成分による AD 予防法がの確立が期待されている。シソ科植物に含まれるポリフェノールの一種であるロスマリン酸（RA）は、AD の原因物質とされる脳内のアミロイドβに対して高い凝集抑制能を示すことが報告されている（Ono et al., 2004, Hamaguchi et al., 2009)。しかし、実際に RA の摂食により AD に伴う認知機能低下を抑制できるかに関しては、作用機序を含め未検討な点が多い。そこで本研究では、RA の抗 AD 作用に関して多角的に検証することを目的とした。

【方法】
2 か月齢の AD モデルマウス（3×Tg-AD）を対照群と RA 群に分け、対照群には通常の粉末飼料を、RA 群には 0.5%RA を含む飼料を自由摂食にて与えた。9 か月齢時に認知行動試験として Y 字迷路および新奇物体認識試験を実施し、10 か月齢時に解剖へ供して脳を採取した。アミロイドβおよびリン酸化タウの免疫組織染色により各群の病理進行を確認するとともに、タウのリン酸化酵素遺伝子の発現変動を定量した。さらに、記憶を司る脳領域である海馬の DNA マイクロアレイ解析から、RA 摂食による認知機能改善メカニズムを検討した。

【結果・考察】
認知行動試験の結果、対照群に対して RA 群で認知機能の改善が認められた。また、免疫組織染色では、扁桃体のアミロイドβおよび海馬のリン酸化タウの蓄積抑制が見られたことから、RA 摂食は認知機能および AD 病理の両方に対して改善効果を示すことが見出された。リン酸化タウが抑制された一因として、海馬における *Jnk3/Mapk10* の発現低下を見出した。また、海馬の DNA マイクロアレイ解析から、RA 摂食が AD に伴う異常な GABA シグナルを正常化する機構が示唆された。

なお、本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Alzheimer disease, Rosmarinic acid, functional food

講演番号：2B07p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B07 会場

メタボリックプロファイリング解析による 緑茶品種サンルージュの認知機能低下抑制作用に関与する成分の同定

Identification of the active ingredients improving cognitive function from 'Sunrouge' by LC/MS-based Metabolic Profiling

○北村 稜[1]、野中 遥奈[1]、佐藤 由佳[1]、和才 昌史[1,2]、村田 希[1]、藤村 由紀[1]、立花 宏文[1]（[1]九大院農院・生機科、[2]日本製紙（株））
○Ryo KITAMURA[1], Haruna NONAKA[1], Yuka SATO[1], Masafumi WASAI[1,2], Motoki MURATA[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Nippon Paper Industries Co., Ltd.)

【背景および目的】
緑茶の飲用習慣は、加齢による認知機能低下リスクの低減に関連があることが、ヒトを対象としたコホート研究で報告されている。これまでに我々は、他の緑茶品種と比較して特徴的な成分を含んでいる新緑茶品種「サンルージュ」が老化促進モデルマウスにおいて、長期記憶能力および学習記憶能力の低下を予防することやアセチルコリンエステラーゼ（AchE）の活性を阻害することを見出している。そこで本研究では、サンルージュの認知症予防作用を担う成分をメタボリックプロファイリング法により同定することを目的とした。

【方法および結果】
サンルージュを含む茶 43 品種の熱水抽出物を作製し、AchE 活性に対する影響を検討した。その結果、サンルージュとその親品種である茶中間母本農 6 号は、他の緑茶品種と比較して高い AchE 活性阻害効果を示した。また、LCMS-IT-TOF（Shimadzu）を用い、茶 43 品種の各茶葉熱水抽出物中の低分子代謝物の測定を行った。得られた茶 43 品種の MS スペクトルデータと AchE 活性データを SIMCA（Umetrics）による多変量解析したところ、AchE 阻害活性に寄与する成分のピークデータを取得することができた。得られたピークに関してデータベース（MassBank, METLIN, KNApSAcK）により検索を行い、候補に挙がった化合物について標品を用いた MS/MS 解析により同定を行った結果、AchE 活性に寄与する成分が数種類同定された。同定した成分の AchE 活性を測定し IC_{50} 値を算出したところ、ミリセチンの IC_{50} 値が他の成分と比較し低値を示した。そこで、ミリセチンの認知機能低下抑制作用を検討するために、老化促進モデルマウスに長期摂食させ、認知機能を評価する行動試験を行った。ミリセチンの摂食により認知機能の低下が抑制されるとともに、老化促進モデルマウスの脳中 AchE 活性は有意に低下した。以上の結果より、他の茶品種と比較してサンルージュに多く含まれるミリセチンは認知機能低下抑制作用および AchE 阻害活性を示すことが確認され、サンルージュの認知症予防作用を担う成分の一つである可能性が示された。

Myricetin, dementia, Metabolic Profiling

講演番号：2B07p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B07 会場

鶏肉イミダゾールジプチド摂取によるアルツハイマー病予防の可能性

Anserine/carnosine supplementation may prevent onset of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a randomized placebo-controlled trial

○舛岡 伸高[1,2]、良峰 千歳[1]、堀 真理恵[1]、朝田 隆[3]、久恒 辰博[1]([1]東京大学新領域、[2]手賀沼病院、[3]メモリークリニック御茶ノ水)
○Nobutaka MASUOKA[1,2], Chitose YOSHIMINE[1], Marie HORI[1], Takashi ASADA[3], Tatsuhiro HISATSUNE[1] ([1]GSFS, University of Tokyo, [2]Teganuma Hospital, [3]Memory Clinic Ochanomizu)

＜背景＞ これまでに我々は脊椎動物に内在するジペプチドであるアンセリンとカルノシンのサプリメント（ACS）が、健康老年者で認知機能維持に働くことを示した。今回は、ACS が AD 発症を抑制するかを、二重盲検プラセボコントロールランダム化比較試験により調査し、報告する。対象者は、軽度認知障害者(Mild Cognitive Impairment, MCI)とした。(アルツハイマー病(Alzheimer’s Disease, AD）の前駆段階であり、しかも、時に健常な脳機能状態への可逆的な状態である。）AD の最も強い遺伝因子はアポリポタンパクＥのε4 アレル（APOE4）で、日本人の約 20%が保有し、1 アレルによるオッズ比は約 5 である。そこで、APOE4 の有無によるグループ毎の解析も実施した。
＜方法＞ 本調査では、MCI 対象者を ACS 群：Placebo 群=1:1 に無作為割付けして、12 週間の投与介入試験を実施し、各群 25 名、総平均年齢 72.8 歳の計 50 名分のデータ採取をし、解析に供した。ACS 投与群には 1 日あたり鶏肉由来のアンセリン 750mg とカルノシン 250mg とを投与した。AD 発症は、4 週間毎の臨床家による診察時の診断により見出した。加えて、我々は、半構造化面接フォーマットの認知症ステージングツールである Clinical Dementia Rating (CDR)、認知症水準がカットオフ値 23/24 点とされるミニメンタルステート検査(MMSE)を介入前後に実施し、生活機能と認知機能の水準の変動を追った。解析では、各尺度による変化量の比較に、年齢、性、肥満度、被教育年数、APOE4 保有有無を独立変数とする重回帰モデルを採用して、多変量解析を行った。
＜結果＞ 介入期間中にアルツハイマー病の臨床診断をされた対象者数は、ACS 群で 0 名、Placebo 群で 4 名であった。(p=0.0371) 全体 CDR の指標では、健常水準への改善があった対象者は ACS 群で 8 名（24%)、Placebo 群で 2 名（8%）であった。全体 CDR の変化量は ACS 群で-0.12±0.22、Placebo 群で-0.02±0.18 であった。(p=0.0231) MMSE スコアがカットオフ値を下回る認知機能低下が見られた者は、ACS 群で 2 名、Placebo 群で 7 名あり、ACS 群での悪化が傾向有意に少なかった。(p=0.0657) APOE4 保有者のサブグループ解析では、全体 CDR の変化量は ACS 群で-0.25±0.27、Placebo 群で 0±0.21 と ACS 群で有意な改善が認められた。(p=0.0261) また、同保有者では、MMSE の変化量でも、ACS 群で-0.25±1.4、Placebo 群で-1.6±1.5 と点数の低下は ACS 群で小さかった。(p=0.0253)
＜結論＞ 臨床診断、対象者と家族に対する面接フォーマットによるステージング、対象者への認知機能検査結果のいずれにおいても、経口 ACS 投与は、APOE4 保有者をはじめとする MCI 患者において、AD 発症への抑止作用をもつ可能性が示された。

imidazole dipeptide, Alzheimer's disease, disease prevention

講演番号：2B07p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B07 会場

脳内セリン充足度の低下が脳高次機能障害を惹起する分子機序
Proteomics Analysis of Brain-Specific *Phgdh* knockout mice: alteration in neuronal cytoskeletal regulation.
○濱野 桃子[1,2]、佐藤 和貴[3]、河野 唯[2]、原口 祐里奈[2]、立川 正憲[3]、古屋 茂樹[2,4] ([1]福岡女子大、[2]九大院生物資源、[3]東北大院薬、[4]九大バイオアーキ)
○ Momoko HAMANO[1,2], Kazuki SATO[3], Yui KAWANO[2], Yurina HARAGUCHI[2], Masanori TACHIKAWA[3], Shigeki FURUYA[2,4] ([1]Fukuoka Women's Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Tohoku Univ., [4]Bio-Archi.Kyushu Univ.)

非必須アミノ酸の一種である L-セリンは解糖系中間体である 3-ホスホグリセリン酸から 3 段階の酵素反応を経て生合成される。*de novo* セリン合成の第一段階を触媒する酵素である 3-Phosphoglycelate dehydrogenase (*PHGDH*)をコードする遺伝子に変異を持つ常染色体劣性疾患であるセリン合成不全疾患は、小頭症や精神発達遅滞など通常の生活が困難な重度の中枢神経機能障害を呈す。さらに、精神疾患のうち発症頻度が高いとされる統合失調症においても、発症家系の遺伝学的解析により *de novo* セリン合成の第 2 段階を触媒する Phosphoserine aminotransferase 1（*PSAT1*）の発現異常が報告されている。これらヒト疾患の病態において十分量のセリン合成を担えていないことが病態の根底にある原因であることが推察されるが、病態の分子機序については不明な点が多い。

我々はこれまでに、脳内でアストロサイトに発現している *Phgdh* を GFAP-Cre で不活性化することで脳特異的 *Phgdh* ノックアウト（BKO）マウスを作製し、ヒト合成不全患者に見られる小頭症に加え、感覚情報フィルター機能を含む複数の脳高次機能の異常を見いだしてきた。そこで、本研究では BKO マウスを用いて脳内 L-セリン欠乏がもたらす分子病態メカニズムを解明することを目的とし、BKO マウス脳のタンパク質発現変化を標的絶対定量プロテオミクスにて解析し、表現型の鍵分子の同定を試みた。

BKO および同腹対照群（Floxed）マウス成獣脳を採取し、synaptosome、cytosol 及び crude membrane の画分を LC-MS/MS によるプロテオミクス解析に供した。Floxed マウスと比較し BKO マウスで 2 倍以上及び 0.5 倍以下に発現変化がある分子をスクリーニングした。

2 倍以上及び 0.5 倍以下に発現変化があった分子を 55 分子同定した。0.5 倍以下に発現低下したタンパク質のうち、微小管結合タンパク質である Microtubule-associated protein 6（Map6）が顕著に発現低下していた。さらに、ウエスタンブロット法によりタンパク質発現低下の再現性を確認した。Map6 は中枢神経系において微小管の安定化と神経回路網形成に関与し、Map6 ノックアウトマウスは統合失調症に類似した種々の行動・代謝異常を示すことから、脳内セリン欠乏による Map6 の発現低下が脳高次機能障害を惹起する一因である可能性が示唆された。

L-Serine, Schizophrenia, Proteomics

発表責任者：古屋茂樹（shigekifur@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B07p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B07 会場

微細藻類由来スクアレンの神経保護作用を介した空間学習記憶改善効果の解明

Elucidation of spatial learning memory improvement effect through neuroprotective action of microalga-derived squalene

○酒井 宏子[1]、佐々木 一憲[2,3]、吉田 昌樹[1,4]、出村 幹英[1,4]、渡邉 信[1,4]、礒田 博子[1,2]（[1]筑大院・生命環境、[2]産総研・触媒化学融合研究セ、[3]筑波大院・数理物質、[4]筑大・藻類バイオマスセ）
○Hiroko SAKAI[1], Kazunori SASAKI[2,3], Masaki YOSHIDA[1,4], Mikihide DEMURA[1,4], Makoto WATANABE[1,4], Hiroko ISODA[1,2] ([1]Graduate School/Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Interdisciplinary Resarch Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), [3]Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, [4]Algae Biomass and Energy System R&D Center)

【目的】
藻類は水圏を中心とした環境中に広く生息する生物である。現在 4 万種以上が記載され未発見・未記載のものを含めれば総種数は 30 万とも考えられている。一方で藻類由来の生理活性物質や機能性に関する知見は報告が少ない。当研究室において、スクアレンを多量に生産する微細藻類の抽出物および微細藻類由来のスクアレンについて、マクロファージ細胞での抗炎症作用が見出されている。さらに動物レベルの実験系において、同抽出物が抗うつ薬であるイミプラミンとほぼ同等の抗ストレス作用を示すことが明らかにされている。本研究では、これらの藻類抽出物を用い、抗老化作用について、老化症状の一つである学習記憶能力の低下に着目し、老化促進モデルマウスである SAMP8（Senescence-accelerated mouse prone 8）およびヒト神経細胞の SH-SY5Y 細胞を用いて空間学習記憶改善作用およびそのメカニズムである神経細胞保護作用を検証した。
【方法および結果】
本研究では、微細藻類試料は藻類バイオマスセンターより提供された凍結乾燥粉末のエタノール抽出物およびカラムクロマトグラフィーにより分画したスクアレンをより多量に含むスクアレン画分を実験に供した。尚、動物実験の際は溶媒を除去し蒸留水で溶解し用いた。SAMP8 に 30 日間試料の経口投与を行い、その後モリス水迷路試験を用いて空間学習記憶能力を評価したところ、藻類抽出物を経口投与した SAMP8 において、水を投与した SAMP8 と比較して有意な空間学習記憶改善作用が示唆された。またスクアレン画分経口投与群においても同様に有意な空間学習記憶改善作用が認められた。さらに細胞レベルの実験により、藻類抽出物がアミロイドβ毒素による細胞死を有意に抑制することが認められ、神経細胞保護作用効果が示唆された。同様にスクアレン画分およびスクアレンにおいても神経細胞保護作用効果が認められた。
【考察】
本研究において藻類抽出物およびスクアレンをより多量に含むヘキサン層の空間学習記憶改善作用が認められ、またそのメカニズムとして神経細胞保護作用効果が示唆された。また、スクアレン単体処理においても神経細胞保護作用効果が認められたことから、藻類抽出物の示す空間学習記憶改善作用はスクアレンが活性成分の一つであることが示唆された。今後はマウス脳における神経伝達物質やアミロイドβの定量、遺伝子解析を行い、空間学習記憶改善作用のメカニズムを明らかにしていく。

Algae, spatial learning memory, neruon

講演番号：2B07p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B07 会場

フェルラ酸のエネルギー代謝促進作用を介した抗うつ様効果

Anti-depressant like effect on ferulic acid through the activation of energy production activity

○岩田 望[1]、佐々木 一憲[2,3]、礒田 博子[1,2]（[1]筑波大生命環境系、[2]産総研・触媒化学融合研究セ、[3]筑波大院・数理物質）
○Nozomu IWATA[1], Kazunori SASAKI[2,3], Hiroko ISODA[1,2] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Interdisciplinary Resarch Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), [3]Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba)

【背景・目的】現在のうつ病患者数は世界で３億５千万人を上回り(WHO)、治療には脳内の神経伝達物質を増加させるセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬のような抗うつ薬が処方される。しかし、既存の抗うつ薬には自律神経に障害を与える抗コリン作用が確認され、眩暈や視力低下などの副作用が問題となっている。近年、副作用を軽減する植物由来成分の抗うつ薬様効果が注目されている。当研究室の先行研究において、薬用植物の一種である *Cymbopogon schoenanthus* 抽出液（CSE）が、動物のストレス行動を評価する尾部懸垂試験（TST）及び強制水試験による無動時間の増加の抑制などの抗うつ作用を示すことが明らかとなり、その主成分であるフェルラ酸においても抗うつ作用を示すことを確認した。本研究では、フェルラ酸の抗うつ作用のメカニズム解析を、ヒト神経細胞を用いたストレス評価モデルおよびストレスモデルマウス脳のマイクロアレイ解析手法を用いて解明することを目的とした。
【方法・結果】神経モデル細胞の SH-SY5Y 細胞にストレスホルモンであるデキサメタゾン（DEX）処理を行った細胞レベルにおけるストレス評価モデルを用いてフェルラ酸の神経保護作用を検証したところ、フェルラ酸処理群において DEX による細胞の減少を有意に抑制することが認められた。またそのメカニズム解析として、細胞内活性酸素種（ROS）および ATP 産生の測定を行ったところ、フェルラ酸の DEX による細胞内 ROS の増加抑制および ATP 産生の増加が認められた。さらに、7 日間フェルラ酸を経口投与し、尾部懸垂試験を行った ICR マウスの脳組織を用いたマイクロアレイ解析により、フェルラ酸経口投与マウス脳において、エネルギー産生に関わる PDK4 などの解糖系、TCA 回路、電子伝達系に関わる遺伝子や、SGK1 などの細胞増殖に関わる遺伝子、さらに Ddc などの神経伝達物質産生に関わる遺伝子群の有意な増加認められた。特にエネルギー産生や細胞増殖に関わる遺伝子については既存の抗うつ薬であるブプロピオン経口投与マウスと比較してより顕著な増加が確認された。
【考察】本研究の結果より、フェルラ酸が DEX の誘導する ROS の増加及びそれに伴う ATP 産生量の低下を抑制することで神経保護作用を示すことが *in vitro* 試験により明らかとなった。さらにマイクロアレイ解析により、フェルラ酸の特徴的な抗うつ作用メカニズムとして、解糖系、TCA 回路、電子伝達系に関わる遺伝子の発現増加によるエネルギー代謝促進作用、およびそれに伴う細胞増殖促進作用を示すことが示唆された。

Ferulic acid, depression, Dexamethasone

発表責任者：岩田望（s1410639@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2B07p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟南 B07 会場

唾液分泌促進作用および塩味後味を示す pellitorine の構造活性相関

Structure-activity relationship of pellitorine, a sialogogic and salty-aftertaste substance in spicy herbs

○奥 直也、森岡 静香、岩崎 春香、五十嵐 康弘（富山県大工・生工セ）
○Naoya OKU, Shizuka MORIOKA, Haruka IWASAKI, Yasuhiro IGARASHI (Toyama Pref. Univ.)

【目的】生薬「細辛」はウマノスズクサ科ウスバサイシン(*Asiasarum sieboldii*)やケイリンサイシン(*Asiasarum heterotropides*)の根を干したものであり、歯痛・去痰・鎮咳・鼻炎などに用いられてきた。本生薬が名前に冠する辛味は、麻痺性の刺激味であり、唾液の分泌促進と塩味の後味を伴う。当研究室ではこれら付随的作用の応用を視野に物質的本体を同定した結果、既知の刺激味物質 3 種を含む計 4 種類のイソブチルアミドを得ている。今回、刺激味・唾液分泌促進作用・塩味後味の分離を目指し、最も構造の単純な pellitorine((2*E*,4*E*)-*N*-isobutyldeca-2,4-dienamide)の構造活性相関研究を行った。
【方法】pellitorine のアルキルアミノ基・アミド結合・アシル基をそれぞれ構造展開した誘導体を化学合成し、HPLC で精製後、官能評価した。
【結果】計 12 化合物を合成した。官能評価の結果、アルキルアミノ基β位の分岐・アミド結合・炭素数 8 以上の共役ジエンの存在が、刺激味・唾液分泌促進作用・塩味後味の発現に必須であることが明らかとなった。またこれらの作用は分離できず、アシル基の炭素数が 9 のとき最大となった。

salty, sialogogue, pellitorine

発表責任者：五十嵐康弘（yas@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2B07p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟南 B07 会場

クラス B スカベンジャー受容体 I に対するリガンド結合評価のための in vitro アッセイ系の確立
Development of an in vitro assay system for the evaluation of ligand binding to scavenger receptor class B member I

○木本 悠作[1]、都築 巧[2]、井上 和生[2] ([1]京大農、[2]京大院農)
○Yusaku KIMOTO[1], Satoshi TSUZUKI[2], Kazuo INOUE[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Kyoto Univ.)

【背景と目的】 2 回膜貫通型膜タンパク質 Cluster of Differentiation 36 (CD36)は口腔内及び鼻腔上部での発現が確認されていることから味覚及び嗅覚との関与が示唆されてきた。本研究室ではこれまでに、CD36 配列のリガンド結合部位とされる領域（149-168）のペプチドを作成し、リガンド物質 oxidized low-density lipoprotein（oxLDL）との結合を利用したリガンドスクリーニングアッセイ系を確立した。また、これを用いて脂肪族アルデヒド等の匂い物質が CD36 リガンドであることを明らかにしてきた。今回、CD36 と同じクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属する Scavenger Receptor class B member 1 (SRB1)も味覚・嗅覚系で機能しているかを明らかにするため、このものが匂い物質等を認識するか検証することを目指した。その一環として本研究では SRB1 において CD36 と同様のリガンドアッセイ系の確立を行った。

【方法と結果】 CD36 ペプチド（149-168）中の Lys-Ser-Lys に着目し、SRB1 配列においてそれに相当する領域（187-206）を定め、N 末端をビオチン化したペプチドを作成した。同様に、配列を入れ替えたスクランブル化ペプチド、配列中の Lys 残基を全て Asn に変換したペプチドも作成した。これらのペプチドを、アビジンコートマルチウエルプレートに固定化させた。合成 SRB1（187-206）ペプチドを用いた時、プレートにリン酸緩衝生理食塩水中に調整した蛍光標識 oxLDL が結合すること、結合は非標識 oxLDL の存在下で阻害されること、蛍光標識 oxLDL の結合数は濃度依存的に増大し飽和に達すること、が示された。一方、スクランブル化ペプチド及び Lys-Asn 変換ペプチドを用いた場合、蛍光標識 oxLDL は結合しなかった。これは、SRB1（187-206）ペプチドが oxLDL に特異的に結合し、結合は特定の配列、特に Lys 残基に依存しているということを示唆している。さらに、競合物質として既知リガンドである 1-(palmitoyl)-2-(5-keto-6-octenedioyl) phosphatidylcholine によって、SRB1 (187-206) ペプチドと oxLDL の結合が阻害されることを確認した。

【結論】本研究の結果より、我々の考案した合成ペプチド SRB1(187-206)はリガンド結合を検出する模擬受容体として活用することができ、本アッセイ系が SRB1 の匂い物質を含めた新規リガンドスクリーニングに有用であるということが示された。

Scavenger receptor class B member I, mimic receptor, ligand assay system

講演番号：2B08a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B08 会場

麹甘酒の糖化工程改変による含有オリゴ糖増量の試み

Development of saccharification process in koji-amazake for effective oligosaccharide production

○小黒 芳史、中村 彩奈、倉橋 敦（八海醸造・研究開発）
○Yoshifumi OGURO, Ayana NAKAMURA, Atsushi KURAHASHI (R&D center, Hakkaisan Brewery Co., Ltd)

【序論】我が国の伝統的米発酵飲料である麹甘酒は、その類似性から「飲む点滴」と言われている。麹甘酒の機能性を検討する上で含有成分の把握や基盤的知見の蓄積は重要であるが、しかし、その含有成分に関する研究報告は意外に少ない。そこで我々は、メタボローム解析を主体として甘酒に含まれる成分の網羅的同定に取り組み、含有糖については、これまでに報告例のなかったソホロース、トレハロースをはじめとする糖類を同定した[1, 2]。各種含有糖量は精米歩合や製麹条件により変わり、また糖化条件の違いによっても変わると考えられるが、これまでに異なる糖化温度による含有糖量の変化を検討した報告例はない。そこで、糖化温度と含有糖量についての検討を行った。
【方法】麹甘酒は、麹と水のみを原料とし、異なる温度条件(40℃、50℃、60℃、70℃)で糖化し、これを経時的にサンプリングした。糖分析は、麹甘酒の遠心上清を適度に希釈し、超高速液体クロマトグラフ-質量分析計(UPLC-MS, Waters 社)により行った。
【結果】糖分析の結果、ほぼ全ての糖類において糖化時間とともに含有量が増加傾向であった。グルコース量で比較した場合、50℃で最大量であり、次いで 60℃での量が多いことから、一般的に言われている糖化温度 50℃～60℃の通り、この温度範囲において糖化効率が良いことを再確認した。トレハロースにおいても 50℃で最大量を示したが、マルトース及びソホロースにおいては 70℃で最大量を示した。マルトースはグルコアミラーゼが 70℃で活性が落ちたために残存したと思われるが、ソホロースはそれを生成する何らかの機構が 70℃付近に存在する可能性が考えられた。三糖では、温度の違いによる含有量の顕著な違いは見られなかった。このように糖化温度の違いにより生成される糖量が異なることが明らかとなり、糖化工程は単に甘くするだけではなく、オリゴ糖を生成するためにも重要な工程であった。本解析をベースに、糖化工程の最適化を進め、麹甘酒の栄養機能性を高めていきたい考えている。

1) Oguro, *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 178-183 (2017).
2) 小黒ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会プログラム集 (3A03p11), 71p.

amazake, koji, sugar

発表責任者：小黒芳史（y.oguro@hakkaisan.jp）

講演番号：2B08a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B08 会場

富有柿由来ペクチンの多糖構造の分析
Analysis of polysaccharide structure of pectin from persimmon, *Diospyros kaki* Fuyu
○後藤 咲季[1]、高山 和江[2]、北口 公司[3,4]、矢部 富雄[3,4] ([1]岐阜大院・応生科、[2]一丸ファルコス、[3]岐阜大・応生、[4]生命の鎖統合研究センター)
○Saki GOTOH[1], Kazue TSUJI-TAKAYAMA[2], Kohji KITAGUCHI[3,4], Tomio YABE[3,4] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. Appl. Bio. Sci., [2]Ichimaru Pharcos, [3]Gifu Univ., Dept. Appl. Life Sci., [4]G-CHAIN)

【目的】水溶性食物繊維の一種であるペクチンは，すべての陸生植物の細胞壁と中葉組織とに偏在している。主にD-ガラクトピラノシルウロン酸がα1,4 グリコシド結合した直鎖状のポリマー単位からなるが，α-L-ラムノシル残基をはじめとする中性糖も約 20%含まれ，種や組織によってその構造は大きく異なっている。柿はその高い栄養価から様々な生理機能が知られているものの，ペクチンの構造についての報告はほとんどない。西日本を中心に各地で栽培されている富有柿は，栽培される甘柿の品種の中で最も生産量の多い品種で，発祥の地である岐阜県においても盛んに生産されている柿である。そこで本研究では，富士，刀根といった他の品種から抽出されるペクチンと富有柿から得られるペクチンを比較し，その多糖の構造特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】3 種の柿（富士・刀根・富有）を凍結乾燥粉末とした後，ペクチンを抽出するために，水溶性画分に対して 80%エタノールにより析出する残渣を AIS（Alcohol Insoluble Solid）として収集した。その後，ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて，抽出されたペクチンを主成分とする多糖類の品種間の比較を行うため，重量平均分子量の測定を行った。また，DEAE-cellulose 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて，濃度の異なる炭酸水素ナトリウム溶液により柿由来 AIS を精製し，主要な画分を得た。ペクチンを構成する側鎖構造の相違を比較するため，主鎖のガラクツロン酸を分解する複数の酵素により柿ペクチンを処理し，その後透析を行うことでペクチンの側鎖を精製して分析した。さらに，柿由来ペクチンの主鎖の構造的特徴を解析するため，滴定法によりエステル化度を算出した。
【結果】品種の異なる柿よりそれぞれ AIS の抽出を行い，ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて測定後算出した重量平均分子量によると，3 品種間（富士・刀根・富有）に大きな差がみられた。また，酵素処理によって主鎖を分解し，側鎖構造を重量平均分子量によって比較すると、3 品種間で大きな違いはみられなかった。ただし，富有は富士と比較して酵素処理前後の重量差が大きく，主鎖の鎖長が長い可能性が考えられた。このことから，柿由来ペクチンの側鎖は異品種間でも類似しており，主鎖の長さに違いがみられる可能性が示唆された。さらに，滴定法により測定した富有柿由来ペクチンのエステル化度は 45.9%であった。一般に天然由来のペクチンはエステル化度の高い HM(High Methoxy)であることが知られているが，富有柿由来ペクチンはエステル化度の低い LM(Low Methoxy)ペクチンであることが示された。

pectin, persimmon, polysaccharide

講演番号：2B08a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B08 会場

大豆発酵食品中オリゴ糖の腸管膜における生理作用および定量分析

Contents of oligosaccharides in soybean fermented food and physiological effects n intestinal membranes

○石川 千秋、森光 康次郎（お茶大院ライフ）
○Chiaki ISHIKAWA, Yasujiro MORIMITSU (Ocha Univ.)

【【目的】
マンニノトリオース（Mnt）は、大豆発酵食品に特徴的に含まれているα-1,6 ガラクトシル結合を有する三糖である。ビフィズス菌などの善玉菌によって資化され、腸内細菌叢改善作用を持つ。
これまで、当研究室では市販大豆発酵食品中の Mnt 含量を比較し、味噌および納豆中含量の経時的変化について報告してきた。しかし、前駆物質である四糖のスタキオースなど、他のオリゴ糖に比べて Mnt の生理機能性に関する研究報告は少ない。
そこで本研究では、Mnt の腸管での生理機能性について、タイトジャンクション(TJ)と腸管免疫系に対する作用を in vitro の腸管膜モデルにおいて検討した。さらに、Mnt 含量について種々の大豆発酵食品を調製し、含量の経時的変化および大豆発酵食品の種類による差異について調べた。
【方法】
ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を Transwell の多孔性のメンブレンフィルター上に播種し、約 20 日間培養して腸管膜モデルを作成した。腸管膜側への Mnt 含有 HBSS(+)、オリゴ糖無添加 HBSS(+)(control)および他の二糖・三糖添加の場合との比較を行った。
TJ に対する影響：経上皮電気抵抗値(TER)測定およびルシファーイエロー(LY)透過性により評価した。
細胞に対する影響：腸管膜側液による LDH 毒性試験を実施した。
腸管免疫：THP-1 細胞との共培養を行い、ELISA により IL-8 量を定量した。
Mnt 定量分析：熱水抽出により水溶性画分を得た後、定容および遠心ろ過を行い、HPLC に供した。
【結果】
Mnt 生理機能性：4mM-Mnt 含有 HBSS(+)は添加から 30 分後時点で control と比較して、有意に TER を低下させた。この低下は一時的かつ可逆的な変化であり、添加後 6 時間後には元の値まで復帰した。同様に、LY 透過性の面からも Mnt の TJ に対する影響が見られた。また、LDH 毒性試験より、Mnt 含有 HBSS(+)添加による細胞障害は確認されなかった。さらに、腸管免疫系に及ぼす影響についても探索する予定である。
Mnt 定量分析：各種大豆発酵食品中 Mnt 含量について調べた結果より、納豆菌、麹、テンペ菌など、発酵に関わる微生物種の違いにより、Mnt 産生能に差異があることが示唆された。今後、原料大豆の形状による差異についても検討を進める。

manninotriose, intestinal barrier, oligosaccharide

講演番号：2B08a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B08 会場

セルロースナノファイバー経口摂取による消化管内環境の変遷
Effect of the oral intake of cellulose nanofiber on the gastrointestinal environment
○谷 史人[1]、中山 裕介[1]、山野上 実希[1]、森島 美千代[1]、桝田 哲也[1]、塚原 隆充[2]、井上 亮[3]、小川 剛伸[1]([1]京都大院農・食品生物、[2]栄養・病理学研究所、[3]京都府立大・生命環境)
○Fumito TANI[1], Yusuke NAKAYAMA[1], Miki YAMANOUE[1], Michiyo MORISHIMA[1], Tetsuya MASUDA[1], Takamitsu TSUKAHARA[2], Ryo INOUE[3], Takenobu OGAWA[1] ([1]Grad. Schl. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Inst. Nutr. & Pathol., [3]Dept. Agric. Life Sci., Kyoto Prefectural Univ.)

【目的】
植物組織より得られるセルロースを、グラインダーや化学触媒を用いた方法で処理することによって、4～20 nm のナノレベルの幅をもつセルロースナノファイバー(CNF)にまで解繊することができる。このように作製された CNF は、粘性や保水性などの物性を向上させることが知られており、既存の食物繊維への新規機能性の賦与が期待される。そこで、CNF の機能性食品素材としての応用に向けて、CNF を経口摂取した際に発現する生理機能性について、肥満と腸内環境への影響の観点から検証を行った。

【方法】
重量比で 3%の CNF を含有した飼料を、C57BL/6 マウスに 8 週間自由摂食させた。対照群としては、通常の繊維状のα-セルロースを含有した飼料を用いた。マウスの体重変化と摂食量は摂食期間中、経時的に測定した。摂食 8 週間後、静脈血を採取し、血漿中の血糖値および各脂質パラメータを定量した。マウスを解剖し、肝臓、脂肪組織、大腸および盲腸の組織を摘出した。回収した糞便および盲腸に対して、次世代シーケンサーによる腸内フローラ解析を行うとともに、それに伴う盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量の変化を調べた。

【結果】
8 週間の CNF 摂食においては、対照群と比べてマウスの体重と摂食量に有意な変化はみられなかった。しかし、絶食後血糖値や血漿中脂質パラメータ濃度については、対照群と比較して低下していた。また、脂肪組織重量の低下、盲腸重量の増加や大腸全長の伸長が観察された。糞便ならびに盲腸における腸内フローラは、マウスにおいて肥満との相関が報告されている *Firmicutes/Bacteroidetes* 比が低下し、*Akkermansia* 属の構成比が増加していた。盲腸内容物では、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸濃度の増加傾向が見られた。以上の結果から、CNF の経口摂取によって肥満の指標となるパラメータを抑制すると同時に、腸内発酵に関わる組織学的変化や腸内フローラの改善が見られたことから、CNF は、経口摂取において抗肥満や腸内環境の改善などの生理機能性が期待できる食品素材であることが示唆された。

cellulose, nanofiber, gastrointestinal environment

発表責任者：谷　史人（tanifumi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B08a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B08 会場

キクイモ由来イヌリンのプレバイオティクス効果
Prebiotic effects of inulin from Jerusalem artichoke
○森田 朗[1]、原 崇[2]、城 斗志夫[2] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農)
○ Akira MORITA[1], Takashi HARA[2], Toshio JOH[2] ([1]Grad.Sch.Sci.Technol.,Niigata Univ., [2]Fac.Agric.,Niigata Univ.)

【目的】
キク科ヒマワリ属の多年草であるキクイモ（*Helianthus tuberosus*）は、水溶性食物繊維であるイヌリンを 13-20%と豊富に含む。イヌリンは、スクロースのフラクトース残基にフラクトースがβ-2,1 結合で 1～50 個直鎖状につながった構造をしており、収穫直後のキクイモに豊富な高分子イヌリンが貯蔵中次第に低分子化することから、分解を防ぐ貯蔵法の研究が行われている。イヌリンには水溶性食物繊維としての整腸作用の他に、プレバイオティクスとしての働きが期待されている。プレバイオティクスとしては低分子のオリゴ糖の方が好ましいと推測されるが、イヌリンの分子量とプレバイオティクスの効果の関係は明らかにされていない。そこで本研究では、キクイモの貯蔵温度がイヌリンの分子量に及ぼす影響を明らかにするとともに、貯蔵中に生じる高分子イヌリンと低分子イヌリンが乳酸菌などの生育に及ぼす影響を調べた。
【方法】
11月に収穫したキクイモを5℃と20℃で３ヶ月間貯蔵した。凍結乾燥したキクイモに精製水を加え、60℃で振とうすることによりイヌリンを抽出し、得られたイヌリンは Bio-Gel P-2（分画分子量 100-1,800）によるゲルろ過クロマトグラフィーで分離後、各溶出画分の糖をフェノール硫酸法で測定し、その分子量分布を調べた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによりイヌリンを高分子量画分と低分子量画分に分け、研究室所蔵の植物由来乳酸菌５株とヒト由来ビフィズス菌１株に対するプレバイオティクス効果を調べた。プレバイオティクス試験では、各菌をグルコースの代わりに高分子／低分子イヌリンを添加したＭＲＳ液体培地に接種し、菌の成長を 600 nm の吸光度を測定しどちらが効率よく資化されるのか比較検討した。
【結果】
キクイモイヌリンの分子量分布は貯蔵温度 5℃に比べ、20℃では 3 ヶ月の貯蔵で低分子領域が大きくなっていった。しかし、どちらの温度でも 3 カ月間の貯蔵でイヌリンは単糖まで分解されることはなく 2 もしくは 3 糖止まりになることが分かった。また、乳酸菌やビフィズス菌は高分子より低分子イヌリンをより効率よく資化し成長した。プレバイオティクスとして有効にはたらくためにはイヌリンを低分子化することが必要である。今後は貯蔵条件（加工も含め）によってイヌリン分解酵素の活性がどのように変化するかを検討し明らかにしていきたい。

Jerusalem artichoke, inulin, prebiotics

発表責任者：森田　朗（f15m003j@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2B08a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B08 会場

小麦品種間におけるデンプン特性と製麺性との関係

Relationship between starch characteristics and noodle quality among wheat varieties

○牧野 萌弥[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加セ、[3]東京農大応生・化学)
○Megumi MAKINO[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】小麦粉の加工特性は小麦粉中のグルテンの量や質が影響するとされ、多くの研究にてタンパク質が評価の対象となっている。一方、製麺では、グルテンの量も重要とされるが、食感や茹で伸びなどは主にデンプンの性質に左右されるとされ、アミロース含量や粘度特性など様々な検討がなされている。しかし、これら検討は小麦粉より分離したデンプンの性状と小麦粉麺の性状との比較が主であり、小麦品種間でのグルテンの差異が解析に影響を及ぼしている。そこで本研究では、各種小麦粉品種間でのデンプンの特性の差異を解析するため、各種小麦粉から調製した麺およびデンプンの性状解析を行うとともにデンプンにグルテンを添加した麺を作成し検討を行った。
【方法】小麦粉には国内産中力粉のきたほなみ、さとのそら、あやひかり、さぬきの夢、チクゴイズミ、外国産中力粉の手打讃歌（日清製粉社製）の 6 品種を用いた。小麦粉の糊化粘度特性はラピッドビスコアナライザー（RVA、Perten 社製）にて測定した。また、各小麦粉から生麺を調製し、茹で時の吸水率を測定した。小麦デンプンの調製は各種小麦粉に水を加えて生地を形成し、多量の水で洗い出した後に遠心分離により沈殿させ、エタノールにて脱水後に乾燥した。デンプンの糊化粘度特性は RVA にて測定した。また、デンプンの膨潤力はデンプン 500mg に水 25ml を加えて 50～90℃で 30 分間の加熱を行い遠心分離後に得られた沈殿の重量 (Wa) および、得られた沈殿の乾燥後の重量(Wb)から、Wa/Wb として求めた。また、溶解率は遠心分離後に得られた上澄画分を乾燥後の重量(Wc)より求めた。小麦粉より分離したデンプンにグルテン（ADM 社製）を 82:18、84:16、86:14、90:10 の割合で混合し調製した麺について、インストロン社製の圧縮型物性測定機を用いて茹で麺の 70%圧縮時の荷重（N）測定した。
【結果】小麦粉の糊化粘度特性では、最高粘度およびブレークダウンの値があやひかりで最も高く、さとのそらで最も低かった。生麺の茹で時の吸水率は中力粉品種ではチクゴイズミで高く、手打讃歌で低かった。小麦デンプンの糊化粘度特性では、最高粘度の値があやひかりで最も高く、さぬきの夢およびチクゴイズミにおいても高く、さとのそらで最も低かった。また、ブレークダウンの値があやひかりで最も高く、さとのそらで最も低かった。デンプンの膨潤力および溶解率はいずれの品種においても温度上昇に伴って値が高くなり、70℃までは品種間に差は見られず、90℃においてはあやひかりで最も高くさとのそらで最も低かった。さらに、手打讃歌より分離したデンプンとグルテンを用い調製した麺は、グルテン割合の増加に従い 70%圧縮時の荷重が高くなった。

noodle, starch, wheat

講演番号：2B08a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B08 会場

発酵小麦デンプン粒の表層脂質が同デンプンの糊化およびゲル化特性に与える影響

Effects of surface lipids of fermented wheat starch on gelatinization and gel physical property of wheat starch

○羽賀 大海[1]、野口 治子[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○Hiromi HAGA[1], Haruko NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo univ. Agric.)

【目的】

発酵小麦デンプンとは、麩（グルテン）を製造する際に副生されるデンプンを長期間発酵させたもので、久寿餅の原料である。久寿餅は、未発酵の小麦デンプンゲルに比べて柔らかくて粘りが小さく、歯切れの良い食感を示す。これまでに、発酵小麦デンプンのデンプン粒表層のタンパク質を除去することで、糊化温度が低下し、ゲルの硬さが増加することなどが確認され、デンプン粒表層のタンパク質が発酵小麦デンプンの糊化粘度特性、ゲル物性に影響を及ぼすことを報告した。塩野らの研究によりデンプン粒表層および内部に脂質が存在することが報告されている[1)]。そこで、塩野らの方法に従い、デンプン粒表層の脂質を除去した場合の発酵小麦デンプンの粘度特性やゲル物性に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】

小麦デンプンと発酵小麦デンプンを水で洗浄した後、エタノール脱水し試料として用いた。それぞれのデンプンにクロロホルム-メタノール(2:1)混液を加え振盪し、デンプン表面の脂質の抽出を行った。回収したクロロホルム画分から溶媒を減圧留去し、脂質抽出物の重量を測定した。Rapid Visco Analyzer(RVA 、フォスジャパン社製)にて各デンプン試料の 8%（乾物換算）における糊化特性を測定し、さらに同糊液の粗熱を取り除き、4℃で保存しゲルを調製した。保存後 1 時間および 24 時間のゲルの物性をテンシプレッサー(My Boy Ⅱ、タケトモ電機社製)にてワンバイト法で測定した。また、TLC にて脂質の分析を行った。

【結果】

未発酵に比べ発酵小麦デンプンの脂質抽出量が多かった。糊化特性において、脂質の除去によって粘度が上昇し、特に最終粘度において発酵小麦デンプンで約 320cp、未発酵の小麦デンプンで約 170cp 上昇した。脂質を除去した両デンプンのゲルの硬さ、付着性、噛み応えの値が増加しその増加率は発酵小麦デンプンが未発酵小麦デンプンに比べ大きかった。TLC の結果より、発酵および未発酵小麦デンプン粒表層の単純脂質の組成に大きく差はみられなかった。

１）日本食品保蔵科学会誌 43(2), 71-75, 2017

wheat starch, fermentation, lipids

講演番号：2B08a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B08 会場

せん断力を加えた米ピューレの物性と澱粉分子構造の解析

Physicochemical properties of ground rice puree and molecular structure of starch

新田 陽佳[1]、長谷部 満[1]、保坂 優子[2]、涌井 徹[1]、○藤田 直子[2]([1]大潟村あきたこまち生産者協会、[2]秋田県立大生物資源)
Haruka Nitta[1], Michiru Hasebe[1], Yuko Hosaka[2], Toru Wakui[1], ○Naoko Fujita[2] ([1]Ogata Village Akitakomachi Rice Producers Co.Ltd., [2]Akita Pref. Univ.)

我が国では、米粉はせんべい、団子などの和菓子への利用が主体である。中国や東南アジアでは、ビーフンやフォーといった米粉を使った麺が製造されている。近年、パンや洋菓子などの小麦粉や卵等を主体とした加工食品への米粉の利用も広がりつつあり、小麦粉の一部あるいはすべてを米粉で代用することが試みられている。小麦粉や卵等が主体の加工食品に、米粉や α 化米粉を加えると、モチモチやしっとりした食感になり、米粉の風味が感じられるようになる。また、焼成するとサクッとした食感になり、米特有の食感や風味を与えることができる。さらに、米の消費拡大につながることも期待されている。しかしながら、小麦粉の一部を米粉で代替する場合、米粉と小麦は混ざりにくく、時間がたつと米が老化し、ボソボソの食感になったり、均一に気泡が入らない、といった仕上がり品質が低下するという問題点がある。また、グルテン濃度が低下するのに加えて、米粉がグルテン構造体の形成を阻害し、混練して発酵焼成させたときに膨らみが不十分になるという問題点もあった。このような問題点に対し、米を無酸素状態で蒸気加熱処理した後、裏ごしして米をピューレ状とし、これを小麦粉と混合することなどが試みられている。これを用いれば、発酵焼成させたときの膨らみはある程度改善される。

本研究では、従来のピューレを石臼式磨砕器によりせん断力をかけた新規の米ピューレの物性およびパンに加えた際の効果を調べた。また、澱粉構造を調べ、物性との関連を考察することを目的とした。各ピューレの硬さと粘着力をテクスチャー試験機(TEX-100N)で測定したところ、新規ピューレの硬さと粘着性は従来ピューレと比べて顕著に低い値を示した。また、試作後 72 時間冷蔵保管した新規ピューレは、従来ピューレより顕著に柔らかさを維持していた。次にこれらのピューレおよび白米粉を小麦粉の 15%と置き換えたパンを試作したところ、新規ピューレを混合させたパンが最もふくらみが良かった。発酵後の生地の電子顕微鏡観察より、新規ピューレは、小麦の澱粉粒をコーティングしたような状態となっており、他のパンと比べて空隙が少なかった。両ピューレのアミロペクチンの鎖長分布はほぼ同一であったが、新規ピューレのアミロペクチンの分子量は、従来ピューレよりも低下していた。以上のことから、石臼式磨砕器によりせん断力をかけた新規ピューレは裏ごしのみの従来ピューレと比べて粘度が低く、老化しにくかった。また、小麦とも混合されやすく、パンに加工した際も硬くなりにくいことが明らかになった。せん断により、アミロペクチンのクラスターの非結晶領域が切断されたためであると考えられる。

rice puree, starch, bread

発表責任者：藤田直子（naokof@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2B08a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B08 会場

ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性

Desiccation tolerance of starch gels containing borax

○上沢 七海[1]、星野 優人[1]、伊藤 博[1]、小林 厚志[1,2] ([1]日大工、[2]日大工・工学研究所・生物境界面の機能工学プロジェクト)
○Nanami KAMIZAWA[1], Yuto HOSHINO[1], Hiroshi ITOH[1], Atsushi KOBAYASHI[1,2] ([1]College of Engineering, Nihon Univ., [2]RIE, College of Engineering, Nihon Univ.)

【緒言】我々はこれまでに、澱粉ゲルの形成に対するオキソ酸の添加効果について検討を行ってきたところ、オキソ酸イオンの中でもホウ酸イオンの添加が澱粉のゲル化に大きな影響を与え、その影響は澱粉の種類によって大きく異なることを明らかにしてきた。ホウ酸の添加による澱粉のゲル化の促進は、水溶液中でホウ酸イオンとヒドロキシ基によるホウ酸エステルの自発的な形成による澱粉の化学ゲルの形成が主要因であると予想される。今回、ホウ酸添加澱粉ゲルの安定性を評価するために、加熱式水分計を用いる澱粉ゲルの保水能の評価を行ったので報告する。
【方法】澱粉はトウモロコシ澱粉、コムギ澱粉、バレイショ澱粉及び可溶性澱粉を用いた。ホウ酸源として四ホウ酸ナトリウム(Borax)を用い、ゲル形成に用いる Borax 水溶液濃度は 0.10 M とした。サンプルの糊化は内径 2.7 cm のプラスチックチューブを用い、76 °C、100 rpm、20 分間恒温振とう水槽内で行った。ゲル化の確認は、純水または Borax 水溶液の体積を 20 mL として所定の濃度になるように澱粉を加え、糊化後は 20 °C の恒温槽内で 26 時間静置し、その後、試験管倒立法によって行った。測定は糊化後のサンプルを 1.0 g 秤量し、100 °C における質量の変化率を水分計により行った。
【結果と考察】トウモロコシ澱粉の保水能の評価を行ったところ、無添加のトウモロコシ澱粉ゲル(10wt%)の場合は約 10 分で完全に水分が蒸発したが、Borax を添加した場合は 15 分以上必要であった。一方、可溶性澱粉に対する Borax 添加による保水能への効果はみられなかった。したがって、澱粉ゲルの保水能に対する Borax の添加効果は、澱粉の種類により異なることがわかった。すなわち、アミロース成分を多く含む可溶性澱粉においてはホウ酸エステルの形成が少なくゲルネットワーク構造が弱く、一方、アミロペクチン成分を多く含むトウモロコシ澱粉ではホウ酸エステルの架橋により保水能が向上したものと予想される。次に pH の影響を調べるために pH を 11 付近に調製した Borax 水溶液を用いて可溶性澱粉ゲルの乾燥速度を測定したところ、乾燥速度が大きく低下する結果を得た。これは pH11 付近においては四配位のホウ酸イオンが優勢になり、澱粉分子間のホウ酸エステル形成が促進したためと考える。その他諸条件における各澱粉の保水能の変化については当日報告する予定である。

Starch, Borax, gelation

講演番号：2B08a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B08 会場

ジャポニカ米の脂肪酸組成と糊化特性、ヨード呈色多波長走査分析との関係
Relationship between fatty acid conposition, pasting properties and iodine absorption analysis of Japonica rice

○中村 澄子[1]、桂 順二[2]、丸山 恭弘[2]、大坪 研一[1] ([1]新潟薬大、[2]エヌエスピー)
○Sumiko NAKAMURA[1], Jun-ji KATSURA[2], Masahiro MARUYAMA[2], Ken'ichi OHTSUBO[1] ([1]NUPALS, [2]NSP Co.)

【背景及び目的】

玄米には約 3%の脂質が含まれ、米油の機能性として、抗酸化性、免疫賦活機能、コレステロール低下作用などが報告されている。脂肪酸には、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、さらに不飽和度の高い多価不飽和脂肪酸等があり、生体膜の構成成分、エネルギー源、脂質メディエーター前駆体としての機能が報告されている。我々は、昨年、インディカ米、ジャポニカ米等の遠縁品種間の脂肪酸組成について報告した。[1)] 本研究では、わが国の各種のジャポニカ米同士の脂肪酸組成の比較を行うとともに、脂肪酸組成と糊化特性値およびヨード呈色走査分析による各種指標との関係について検討した。

【試料および実験方法】

試料として、平成 28 年産の国産ジャポニカ米 21 品種を用いた。脂肪酸組成はガスクロ法、糊化特性値はラピッドビスコアナライザー（RVA）法、ヨウ素呈色多波長走査分析は、当研究室で開発した既報の方法で実施した。[2)]

【結果および考察】

α-リノレン酸（18:3n-3)は、ヨード呈色分析のλmax/Aλmax （アミロース含量と負の相関を示す指標)と R = 0.43（p＜0.05）を示し、糊化特性の MaxV/FinalV(難消化性デンプンと負の相関を示す指標)の値と R = 0.44（p＜ 0.05）で正の相関を示した。また糊化特性のコンシステンシー（老化指標）と R = - 0.51（p＜ 0.05）で負の相関を示した。さらに、リノール酸（18:2n-6）は最高粘度と R= - 0.47（p＜ 0.05)、糊化開始温度と R = - 0.46（p＜ 0.05）で負の相関を示した。美味しさの指標とされる「最高粘度」は、アラキジン酸（20:0)と R=0.46 (p＜0.05)、エイコセン酸（20:1)と R=0.49（p＜0.05）、ベヘン酸（22:0)と R=0.66（p＜0.01)、リグノセリン酸（24:0)と R=0.68（p＜0.01）で正の相関を示した。また、コシヒカリ玄米の脂質には、パルミチン酸（21.2%)、オレイン酸(38.9%)、リノール酸(33.3%)が含まれ、国産ジャポニカ米 21 品種において、オレイン酸（18:1）はリノール酸と R= - 0.97（p＜ 0.01)、α-リノレン酸 と R= - 0.51（p＜ 0.05）で負の相関を示した。またパルミチン酸はオレイン酸と R=－0.89（p＜ 0.01）で負の相関を示し、リノール酸と R=0.77（p＜0.01)、α-リノレン酸と R= 0.46（p＜ 0.05）で正の相関を示した。

１）S. Nakamura et al.：Biosci. Biotechnol. Biochem., Doi.org./10.1080/09168451.2017.1387047.
２）S. Nakamura et al: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79(3), 443-455, 2015.

rice, fatty acid, pasting properties

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2B08a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B08 会場

チャノキ脂質中のα-リノレン酸

α-Linolenic acid in the lipids of *Camellia sinensis*

○植田 香織、齋藤 洋昭（石川県立大生物資源環境）
○Kaori UETA, Hiroaki SAITO (Ishikawa Prefectural Univ.)

【背景と目的】

チャノキは加工されるのは主に新芽のみで、茎や葉などの多くの部分はほとんど利用されていない。また、栄養成分についてもほとんど明らかになっていない。さらに茶に関しては、カフェインやビタミン、ミネラル、カテキンなどの成分が主に着目され、脂質などの他の成分はあまり関心を持たれていなかった。そこで、本研究では必須脂肪酸であるα-リノレン酸に着目し、チャノキの脂質の特性を解明することを目的とした。

【実験方法】

黒石茶と静岡茶をそれぞれ芽、葉、茎の 3 部位に分け、メタノール-クロロホルム混合溶媒（Folch 法）で脂質を抽出した。粗製脂質は 1 部をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで総脂質の脂肪酸組成を分析した。また 1 部は、カラムクロマトグラフィーで各脂質クラスに分画した。主要フラクションはメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。

【結果と考察】

黒石茶、静岡茶の脂質含量は、それぞれ葉 2.3、3.2%、芽 1.7、2.2%、茎 0.5、0.9%となり、茶に適した環境で生育した静岡茶の方が全ての部位で高い脂質を示した。総脂質の脂肪酸組成では、両者ともに類似し、いずれも葉では高い濃度でα-リノレン酸を有することが分かった。脂質クラスは、葉、芽、茎ともにモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）、ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）などの糖脂質が豊富であり、脂質の多くが葉緑体のチラコイド膜に由来することが示唆された。これらの結果から、静岡茶、黒石茶ともにα-リノレン酸の供給源として有望であることが示唆された。

α-linolenic acid, n-3 polyunsaturated acid, lipid

講演番号：2B08a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B08 会場

トコトリエノール及びトコフェロールの逆相 HPLC 法による一斉分析

Simultaneous determination of tocotrienols and tocopherols by a reversed-phase HPLC

○赤坂 和昭（尚絅学院大）
○Kazuaki Akasaka (Shokei Gakuinn Univ.)

（目的）

8 種の構造異性体からなるビタミン E（α-, β-, γ -, δ-トコトリエノールおよびトコフェロール）の HPLC による一斉分析は、主に順相系のカラムを用い、ヘキサン/2ープロパノール、或いはヘキサン/ジオキサン/2ープロパノール系の溶媒を用いて行われている。これは、一般的な ODS カラムなどの逆相系では、β -/γ - トコフェロールおよびβ -/γ - トコトリエノールの分離が特に困難なためである。

HPLC 法では、低温条件による分離はほとんど利用されてこなかった。これは、低温条件下では、カラム効率の低下やカラム圧が高くなることなどから、分析時間が長くなるためである。しかし、低温下での分離は、室温と異なる保持特性を示し、室温下では分離が困難な化合物の分離が可能となる場合もある。そこで今回、よりランニングコストの安いメタノール系の溶媒を用いたビタミン E の 8 種の異性体の同時分析法の確立を目的に、分離カラムおよび分離温度を中心に検討した。

（方法及び結果）

α-, β- , γ -, δ-トコトリエノールおよびトコフェロールの 8 種の異性体混合物を試料として、数種の逆相系カラム（ODS および C30）について、室温～-50℃の範囲で各成分の分離について検討した。その結果、ODS カラム系によるβ -/γ - トコフェロールの分離は、カラム温度を下げるに従い分離が向上し、-50℃程度でほぼ完全分離が実現したが、β -/γ - トコトリエノールの分離は困難であった。一方、C30 カラムでは、室温でもβ -/γ - トコフェロールの部分分離は可能で、カラム温度の低下に従い分離は向上し、10℃程度で完全分離することができた。また、ODS カラムで分離が実現できなかったβ -/γ - トコトリエノールについては、室温でわずかに保持時間に差が認められる程度であったが、温度の低下に従い保持時間の差が大きくなり 0℃以下でほぼ完全分離を達成することができた。一方、低温条件でのカラム効率の低下については、流速を下げることにより改善することができ、最終的に、カラムとして Develosil C30-UG-3(4.6 x 150 mm)、移動相としてメタノール（100%）を用い、流速 0.9 ml/min, -4℃で溶出し、蛍光検出（Ex. 297 nm、Em. 325nm）することによりビタミン E の 8 種異性体を 20 分以内で分離分析することができた。検量線は異性体により異なった sub ng ～10 ng 程度の範囲で良好な直線となり、S/N = 3 における検出限界は、0.011～0.055 ng であった。

tocopherol, tocotrienol, reversed-phase HPLC

発表責任者：赤坂和昭（akasaka@shokei.ac.jp）

講演番号：2B08a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B08 会場

カサガイ類の生殖細胞から見いだされた末端二重結合を有する新規ジエン酸群の分布

Occurrence of novel n-1dienoic fatty acids in germ cells of dominant species of Japanese limpets

○川島 英城（岩手県立大学宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】これまでに、アワビに類縁なガカサガイ（優占種：*Cellana grata*, *Cellana toreuma*）の生殖細胞から超多様な非メチレン中断型脂肪酸群（non-methylene-interrupted fatty acid, NMIFA）を見いだした。[1,2,3] この不飽和脂肪酸は二重結合間にメチレン基を２個以上挟んだ構造を持つ、しかし、生物活性やその機能はほとんど明らかにされていない。最近、カサガイから見いだされた NMIFA の中で、23:2Δ9,20 はヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性や GSK-3 β に対する阻害活性（*in vitro*）を示すことが初めて明らかになった。[4] そこで、本研究では生物活性探索に向けて、上記カサガイ類から末端二重結合を有する新規ジエン酸群を新たに見いだしたので、その構造並びに分布特性について報告する。

【方法】前報に従い [1]、採取した三陸沿岸産カサガイ類の生殖細胞から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いて中性脂質・極性脂質にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調製後、不飽和度に応じて硝酸銀 TLC で不飽和脂肪酸 methyl ester の分取を行い、目的のジエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた画分を 3-pyridylcarbinol ester 並びに pyrrolidide 誘導体に直接変換し、GC-EI-MS（70 eV）によりこれらの構造解析を行った。

【結果】カサガイの生殖細胞から、既知不飽和脂肪酸（15:1Δ14、17:1Δ16、19:2Δ9,18）と共に、5 種類の末端二重結合を持つ新規ジエン酸 19:2Δ5,18、19:2Δ7,18、19:2Δ11,18、21:2Δ7,20、21:2Δ11,20 が同定された。次に、19:2Δ9,18 を含む新規ジエン酸の生殖細胞(雌雄)における分布特性を調べた。その結果、ヨメガカサガイ（*C. toreuma*）の雌では前述の 19:2 並びに 21:2 の構造異性体すべてが存在していたが、雄では 19:2 の構造異性体のみに限定されていた。一方、ベッコウカサガイ（*C. grata*）の生殖細胞において、雌はすべて 19:2 の構造異性体は認められたが、雄では 19:2Δ9,18 と 19:2Δ11,18 にとどまり、今回は新規な 21:2 の構造異性体の存在は雌雄ともに確認できなかった。以上の結果から、同定された末端二重結合のジエン酸の中で、優占種カサガイの雌性生殖細胞から 19:2Δ5,18、19:2Δ7,18、19:2Δ9,18、19:2Δ11,18 の存在がはじめて明らかになった。また、ヨメガカサガイの雌性生殖細胞は末端二重結合を有する NMIFA タイプの新規ジエン酸群が極めて豊富であることから、引き続き多様な未知 NMIFA 群の構造を現在解析中である。

参考文献：1) Lipids **47**, 827 (2012), 2) Lipids **51**, 257 (2016), 3) Lipids **52**, 375 (2017), 4) Lipids **52**, 295 (2017)

non-methylene-interrupted fatty acid, limpet gonads, a terminal double bond

発表責任者：川島英城（ajoe@iwate-pu.ac.jp）

講演番号：2B08a14
講演日時：3 月 16 日 11:43～ 共通講義棟南 B08 会場

タイワンシジミ抽出物に含まれる新規セラミドの探索
Isolation and identification of a novel ceramide in freshwater clam (*Corbicula fluminea*)
○山田 耕史[1]、千々松 武司[2]、梅木 美樹[3,4]、小田 裕昭[5]、望月 聡[4] ([1]長崎大院・医歯薬、[2]佐々木食品工業（株）自然食研、[3]別府大・食物栄養、[4]大分大・教育、[5]名大院・生命農)
○ Koji Yamada[1], Takeshi Chijimatsu[2], Miki Umeki[3,4], Hiroaki Oda[5], Satoshi Mochizuki[4] ([1]Nagasaki Univ., [2]Sasaki Food Co., Ltd, Sizenshokken, [3]Beppu Univ., [4]Oita Univ., [5]Nagoya Univ.)

【目的】演者らは、タイワンシジミ（*Corbicula fluminea*）抽出物に血中コレステロール低下作用があることを示してきたが、その作用の中心となる成分は明らかとなっていない[1)]。これまでにタイワンシジミ抽出物の脂質画分およびタンパク質画分ともにコレステロール低下作用を有し、特に脂質画分に強力な作用があることを示してきた[1,2)]。タイワンシジミ抽出物の脂質画分には、コレステロール低下作用が報告されている植物ステロールや、中性脂肪を構成する脂肪酸として多価不飽和脂肪酸が含まれていることが明らかとなっている[1)]。タイワンシジミ抽出物の脂質画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、それらの画分のコレステロール低下作用を検討した結果、もっとも強い活性を示した画分には植物ステロールや中性脂肪は含まれておらず、これらの成分はタイワンシジミ抽出物のコレステロール低下作用に寄与する中心的な成分ではないと考えられた[2)]。今回演者らは、タイワンシジミ抽出物脂質画分から得られたコレステロール低下作用を示す成分の探索を行い、主成分として新規化合物 CFC-1（仮称）を得ることができたので、その構造について報告する。

【方法・結果】４週令の Wistar 系雄性ラットに、高コレステロール食を自由摂食させた高コレステロール血症モデルラットを用いてコレステロール低下作用を示す画分・化合物の探索を行った。タイワンシジミの熱水抽出物を $CHCl_3$：MeOH（2：1）で処理して、脂質画分を得た。得られた脂質画分について、高コレステロール血症モデルラットにおける血中コレステロール低下作用を指標にしながら、シリカゲルカラムクロマトグラフィー並びに液-液分配で分画を繰り返し行い、最後に活性画分を HPLC で精製することによって、CFC-1 を単離することができた。CFC-1 の構造を FAB-MS および NMR スペクトルを用いて解析し、CFC-1 は新規化合物 Ceramide-1-Phosphoramidate であることを明らかにすることができた。

1) Br. J. Nutr., (2011), 105, 526-34.
2) Food Chem., (2013), 136, 328-34.

freshwater clam, ceramide, cholesterol

講演番号：2B08a15
講演日時：3 月 16 日 11:54～ 共通講義棟南 B08 会場

サンゴ礁に生息する貝類脂質：ヤコウガイ等の脂質比較
Analysis of the lipids in the shellfishes in the coral reef
○齋藤 洋昭[1]、久保 弘文[2]、玉城 泉也[3] ([1]石川県立大学、[2]沖縄県水産海洋技術センター、[3]水産研究・教育機構)
○ Hiroaki SAITO[1], Hirofumi KUBO[2], Motoya TAMAKI[3] ([1]Ishikawa Prefectural University, [2]Okinawa Prefectural Fisheries Research and Extension Center, [3]Japan Fisheries Research and Education Agency)

【目的】サンゴ礁域には多様な生物種が知られるが、それらの生体成分特に脂質成分に関する研究は驚くほど少ない。そこで、本研究ではそれらの中で代表的な数種の貝類について脂質を明らかにする。

【方法】試料はいずれも沖縄県で採集された。巻貝としてヤコウガイ（*Turbo marmoratus*)、マガキガイ（*Strombus luhuanus*)、二枚貝としてクロチョウガイ（*Pinctada marlitifera*）について脂質クラスと脂肪酸組成を調べた。すべての脂肪酸は、ジメチルオキサゾリン（DMOX）誘導体に変換後、ガスクロマトグラフィーマススペクトル法で化学構造を決定した。

【結果】ろ過食者であるクロチョウガイでは主要高度不飽和脂肪酸（PUFA）は，アラキドン酸（ARA、20:4n-6)，22:4n-6，22:5n-6，イコサペンタエン酸(EPA、20:5n-3)およびドコサヘキサエン酸（DHA、22:6n-3）であったが、草(植)食性の3種の巻貝ではDHAは低濃度で、かわりに高含量のドコサペンタエン酸(DPA、22:5n-3)が見出された。

【考察】二枚貝・巻貝それぞれ餌料藻類脂質の影響を直接受けると同時に、巻貝におけるDHAの非必須性も示唆された。巻貝で高濃度でARAやn-3DPAが濃縮されていることから、これらの有用脂肪酸の供給源となることが示唆された。

edible shellfish, lipid, fatty acid

発表責任者：齋藤洋昭（hiroakis@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2B08p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B08 会場

潰瘍性大腸炎モデルマウスにおけるタモギダケの脂溶性画分の効果
Effect of dietary golden oyster mushroom lipid soluble fraction on coltis in DSS-treat mice
○木下 幹朗[1]、赤田 康太[1]、猪部 美穂[1]、山下 慎司[1]、松本 聡[2] ([1]帯広畜産大学、[2]エル・エス コーポレーション)
○ Mikio KINOSHITA[1], Kota AKADA[1], Miho INOBE[1], Shinji YAMASHITA[1], Satoshi MATSUMOTO[2] ([1]Obihiro Univ., [2]L/S Corporation)

近年、日本人において過敏性腸炎や潰瘍性大腸炎の増加は深刻になりつつあり、これら慢性的な腸管炎症の継続は、 下痢等による生活の質の低下だけでなく、大腸ガン発症リスクを上昇させる可能性が報告されている。現在まで我々の研究グループはスフィンゴ脂質、ナガイモ抽出成分並びに乳たんぱく質のデキストラン硫酸ナトリウム等を投与した大腸疾患モデルマウスに与える影 響を報告 1,2,3)してきた。キノコ類は食品としての 1、2 次機能だけでなく、その 3 次機能が注目され、抗腫瘍作用等を はじめとする機能性食品としての可能性が示唆されている。 今回は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)、タモギ茸のエタノール抽出 画分並びにこれらの各種脂質画分の潰瘍性大腸炎の実験動物モデル系に与える影響について調査した。

方法）4 週齢の BALB/c マウスを 5 匹ずつ群に分け 6 日間順化飼育した後、2 群ずつ標準飼料(AIN-76)に タモギ茸のエタノール抽出画分を配合（1%並びに 5%）およびこの抽出画分を溶媒分画法によって、中性脂質と極性脂質画分を添加した飼料を給餌した。なお、腸管への炎症はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を飲水させることにより発症させた。試験群で体重減少が認められた 2 日後に、半数のマウスから大腸を摘出し、炎症性サイトカインの変化をサイトカインアレイを用いて半定量的に解析した。また、予備実験として発症レベルをコントロールするために、DSS 投与量の精査を上記のタモギダケ成分給餌実験の前に行った。

結果）DSS の飲水への投与量 0-1.5%で標準飼料で飼育したところ、容量に依存して大腸の収縮、並びに脾臓の増大が認められたが、25 日の飼育時すべての群で死亡例は認められないことから、本実験は 1.5%投与で行った。その結果、食餌性タモギ抽出物は、飼育期間後期の体重減少を抑制し、脾臓重量の増加並びに大腸の収縮を有意に抑制し、炎症を抑制した。また、脂溶性画分を中性脂質画分並びに極性脂質画分に分解して評価した結果、極性脂質画分で炎症抑制傾向が認められた。以上の結果は、タモギダケの脂溶性成分には、抗炎症活性、若しくは腸管保護成分が存在する可能性を示唆した。
１） J.Oleo Sci. 54, 45 2)J. Food Nutr. Res. 52,139 3) Foods 3, 351.

Sphingolipid, Inflammation, Cytokine

講演番号：2B08p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B08 会場

腸管モデル細胞への炎症性刺激に対する スフィンゴ脂質ならびタモギダケ脂溶性画分の影響

Effect of sphingolipid and lipid soluble fraction of golden oyster mushroom on inflammation stress in differentiated Caco-2 cell

○清野 拓哉[1]、山下 慎司[1]、松本 聡[2]、木下 幹朗[1] ([1]帯広畜産大畜産、[2]エル・エスコーポレーション)
○Takuya Seino[1], Shinji Yamashita[1], Satoshi Matsumoto[2], Mikio Kinoshita[1] ([1]Obihiro Univ., [2]L/S corporation)

【目的】スフィンゴ脂質は細胞膜等を構成する主要な脂質の一群で、細胞へのシグナル伝達等の生理作用が報告されると共に、近年、食品機能性について関心が高まっている。演者の研究室ではスフィンゴ脂質の機能性として、現在までにアトピー様皮膚炎症緩和作用、大腸腺腫発症抑制効果、大腸炎症緩和効果等[1,2,3]を報告している。今回は先に報告した大腸炎症緩和効果に注目し、この機能の詳細を解明する目的で腸管モデル細胞である分化型 Caco-2 細胞を用いて炎症性ストレスを与えた際に細胞へ及ぼすスフィンゴ脂質の影響について調査するとともにスフィンゴ脂質が多く含まれるタモギ茸のエタノール抽出画分の効果についても調査した。

【方法】腸管モデル細胞として使用するために Caco-2 細胞を 3 週間コンフルエント状態で培養し、分化型 Caco-2 細胞を誘導した。これに炎症性刺激として LPS (0～50 μg/mL)、TNF-α (0～50 ng/mL)を用いた。スフィンゴ脂質 (グルコシルセラミド [GlcCer]、ガラクトシルセラミド [GalCer]等)及びタモギ茸の脂溶性画分(中性脂質画分と極性脂質画分)をそれぞれ 0～50 μM 添加し、細胞数変動、DAPI 染色による核の形態観察[4]、抗体アレイによるサイトカイン変動、添加後のスフィンゴ脂質の分布、Western Blot による TLR4 の発現量等を調査した。

【結果】分化型 Caco-2 細胞において LPS 及び TNF-α 添加群では細胞増殖の抑制並びにアポトーシス細胞の有意な増加が観察された。一方、スフィンゴ脂質及びタモギ茸脂溶性抽出物の添加がこれらの現象を抑制した。また、サイトカインに関して、LPS 等の刺激は各種サイトカインを上昇させ、GlcCer 等の添加によりそれは抑制される傾向を示した。特に TLR4 シグナルの下流に存在する IL-6, IL-12 等が抑制されていた。また、添加した GlcCer 等は培地並びに細胞表面画分においてよく検出されたことから、スフィンゴ脂質による TLR4 等の細胞表面に発現している受容体への阻害効果により、細胞外からの炎症ストレスを緩和する可能性が示唆された。

1) Ono, J. et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2010). 2) Aida, K et al., *J. Oleo Sci.* (2005). 3) Arai, K. et al., *J. Oleo Sci.* (2015). 4) Kinoshita, M. et al., *Arterio Thromb. Vasc. Biol.* (1999).

Cerebroside, LPS, cytokine

講演番号：2B08p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B08 会場

異なる炊飯ジャーで炊いた米飯に含まれる低分子化合物量の差異について

Difference in the low molecular compounds of cooked rice with different rice cooker

○辻井 良政、髙野 克巳（東京農大応生・化学）
○Yoshimasa TSUJII, Katsumi TAKANO (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】

米飯食味を決定する要因として、硬さや粘りといったテクスチャーやアミロース含量、タンパク質含量、呈味成分、香り、外観など多数の要因があげられる。このような米飯の要因は炊飯方法の違いによって変動し、最近では「米飯の化学的な味を重視する」という風潮もみられる。そこで、本研究では、炊飯ジャーの性能により食味異なる米飯を用いて、特に食味に影響する糖、アミノ酸、有機酸等の低分子量化合物に着目し、新規米飯食味マーカーを確立することにより、炊飯評価をはじめ一般の食味判断、新規炊飯ジャー開発や育種現場での利用を目指している。

【試料および方法】

富山県産のコシヒカリを試料米として用いた。米飯食味に関わる物質を網羅的に解析するため、GC/MS を用いたメタボロミクスいう手法を用いた。すなわち、数種類の炊飯ジャーで炊いた米飯から、33%メタノールにて低分子量化合物を抽出し、濃縮乾固後の残渣にメトキシアミン塩酸塩を 10mg/ml の濃度で脱水ピリジンに溶解させた溶液を加え反応後、MSTFA を加えて誘導体化させた。GC/MS（アジレント・テクノロジー社製 GC 7890B、MS 5977）に供した。データの解析は、Metalign(Lommen, 2009)にてクロマトグラムと MS スペクトルのアライメント処理を行い、AIoutput2(Yuji Tsugawa, RIKEN)を用いて 561 化合物ライブラリー（GL サイエンス社）と照合した。定性された化合物を変数とし、統計解析ソフト Pirouette(GL サイエンス社)を用いてケモメトリックス解析を行った。

【結果】

米飯から再現よく定性された化合物を味質別に分類すると、甘味：5-oxoproline、Alanine、b-Lactose、Fructose、Galactose、Glycerol、Glucopyranose、Glucose、 Glutamine、 Glycine、Inositol、Maltose、Serine、Sorbitol および Sucrose、旨味：Aspartic acid および Glutamic acid、酸味：4-aminobutyric acid、Citric acid、Fumaric acid、L-(+)-lactic acid、Malic acid および Succinic acid、苦味：Isoleucine および Lysine,valine、その他：Asparagine、2-aminoethanol、Indole-3-acetic acid および Pantothenic acid を検出した。主成分分析の結果、サンプルごとに様相が異なっており、炊飯ジャーの違いで検出できる化合物量が異なっていることが分かり、米飯の食味の違い影響を与えている可能性が示唆された。

cooked rice, metabolomics, rice cooker

講演番号：2B08p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B08 会場

日本産、中国産のジャポニカ米の食味の理化学評価
Physicochemical evaluation of palatability of Japanese and Chinese Japonica rice

○大坪 研一[1]、中村 澄子[1]、稲川 拓[1]、露木 恵介[1]、川上 知輝[1]、孫 雅君[2]、河野 元信[3]([1]新潟薬大、[2]中国北方稲作科学協会、[3]（株）サタケ)
○Kenichi OHTUBO[1], Sumiko NAKAMURA[1], Taku INAGAWA[1], Keisuke TUYUKI[1], Tomoki KAWAKAMI[1], Gakun SONG[2], Motonobu KAWANO[3] ([1]NUPALS, [2]ASTNR, [3]Sartake Inc.)

【背景及び目的】
世界において、ジャポニカ米生産量は約 20%とインディカ米に比べて少数派であるが、消費者の良食味米志向を受けて、近年、中国を含めて急速に増加中である。本研究では、日本のジャポニカ米ブランド品種および中国の栽培面積の多いジャポニカ米を試料とし、それらの食味および理化学特性を明らかにするとともに、新たな食味簡易推定方法を開発することを目的とした。

【試料および実験方法】
試料として、平成 27 年産の国産ジャポニカ米ブランド品種 15 種類および中国のジャポニカ米 32 品種を試料とした。水分含量は加熱乾燥法、アミロース含量はヨード比色法、タンパク質は食味計（近赤外分光分析）および SDS-PAGE により、酵素活性およびグルコース含量はキット法により測定した。米飯物性はテンシプレッサーにより測定し、糊化特性試験はラピッドビスコアナライザー（RVA）法、ヨウ素呈色多波長走査分析は、当研究室で開発した方法(S. Nakamura et al, BBB, 2015)で実施した。また、多変量解析による統計処理を行った。

【結果および考察】
新之助は米飯の表層の粘りは弱いが全体の粘りが強く、老化しにくく、なすひかりはアミロース含量が低いものの、米飯の粘りがやや弱いなど、日本の各種ブランド米の食味特性を明らかにした。
中国産米 32 品種の平均とコシヒカリを比較した結果、官能検査(中国産米 76.3、コシヒカリ 88.4)、タンパク質含量（中国産 11.2%、コシヒカリ 5.5%）を示した。テンシプレッサーによる米飯物性値の硬さは、中国産が日本産米の 1.3 倍高く、粘りと付着は、日本産が中国産の 1.3 倍高い値を示した。アミロース含量は、中国産が日本産の 1.1 倍高い値を示した。SDS-PAGE の結果、中国産米にはプロラミン含量の高いものが認められた。中国産米の中には、コシヒカリよりアミロース含量の低いものもあり、米飯物性の粘りの強いものもあり、その特性はきわめて多様であった。中国産米 32 品種の官能検査値を RVA の糊化特性値（最高粘度と糊化開始温度）を変数とする推定式を開発した結果、検量線の決定係数が 0.61 を示し、未知試料による検定では決定係数が 0.57 を示し、適用性が高いことが示された。ヨード呈色走査分析による指標による米飯物性値の Toughness の推定式を作成した結果、検量線の決定係数が 0.64 を示し、未知試料による決定係数が 0.57 を示した。アミロース含量の PLS 解析では、検量線の決定係数が 0.72 を示し、未知試料による検定では決定係数が 0.65 を示した。

rice, palatability, physico-chemical evaluation

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2B08p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B08 会場

コシヒカリの第 3 染色体短腕の良食味 QTL が登熟段階に及ぼす影響について
The effect of the good-eating quality QTL on the short arm of chromosome 3 of Koshihikari at the ripening stage
○木村 圭一[1]、辻井 良政[2]、齋藤 彰宏[2]、堀 清純[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]農研機構作物開発セ)
○Keiichi KIMURA[1], Yoshimasa TSUJII[2], Akihiro SAITO[2], Kiyosumi HORI[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric, [3]NICS)

【目的】
日本のイネの育種において、米飯の食味は重要な選抜対象形質であり、近年 QTL（量的形質遺伝子座）解析が進められ、コシヒカリの良食味に関する QTL が第 3 染色体短腕上に検出されている(Kobayashi and Tomita 2008, Wada *et al.* 2008, Takeuchi *et al.* 2008)。これまでに、その QTL 領域をコシヒカリ型に固定した日本晴の遺伝的背景の置換系統(NSL)を用いて、QTL 領域が米飯の理化学的特性に及ぼす影響を調査してきた。今回は、QTL 領域がイネの登熟過程中の種子に及ぼす影響について検討した。
【試料および方法】
日本晴とコシヒカリの交雑体に日本晴を戻し交雑することにより得られた戻し交雑集団から、食味官能試験の結果より、日本晴よりも食味が向上した NSL-1～3 を選び試料とした。また、コントロールとして日本晴を用いた。これらのイネは、2016 年に東京農業大学世田谷キャンパス内のガラス冷暖房温室（自然光、24℃±4℃）内で 1/5000a ワグネルポットを用いて冠水土耕栽培（市販培土に NPK 混合基肥を加え、ケイ酸 Ca を追肥）し、開花後 7 日（乳熟期)、10 日（乳熟期後期)、14 日（糊熟期)、30 日（黄熟期)、40 日目（完熟期）に胚乳を採取した。7 日から 14 日目の試料は、穎を除去後に胚乳を抽出し、直ちに液体窒素にて凍結し試験まで-80℃で保存した。30 日、40 日目の試料は、試験まで 4℃で保存して約 90%に搗精した後使用した。これらの試料を用いてアミロース組成値、α-アミラーゼなどの米胚乳中の酵素活性量測定および GC/MS を用いて低分子量化合物量を分析した。
【結果】
アミロース組成値は、何れの品種においても開花後 10 日目に最も高い値を示した。NSL-3 のみ日本晴との間に若干の挙動の違いが観察されたが、明確な差異は認められなかった。米胚乳酵素活性量については、多くの酵素で 14 日目に最も高い値を示した。登熟初期では NSL-2 が日本晴に比べて酵素活性量が低い傾向にあったが、登熟が進むとほとんど違いはみられなくなった。低分子量化合物量については、主成分分析の結果、採取日ごとにまとまりはみられたが、品種間の明確な違いは観察されなかった。何れの試験においても登熟が進むにつれて系統間の差異は小さくなる傾向にあった。

rice, physicochemical properties, endosperm

講演番号：2B08p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B08 会場

高脂質ゲルにおけるゲル化剤の効果

Effect of polysaccharides on the high oil containing gel

○中島 聡史、松本 拓矩、秋山 亜希子、増田 麻衣、渡邉 裕一、上田 佳宏（ソマール株式会社）
○Satoshi NAKAJIMA, Takunori MATSUMOTO, Akiko AKIYAMA, Mai MASUDA, Yuichi WATANABE, Yoshihiro UEDA (SOMAR Corp.)

【目的】高齢化社会の課題の一つに高齢者の低栄養状態の予防・改善があげられ、効率よくエネルギー摂取が可能な脂質を多く含有し、摂食しやすい形態（ゲル）である高脂質ゲルが求められる。ゲルを作製するには水溶性高分子ゲル化剤を使用することが一般的であるが、水溶性高分子ゲル化剤を用いた 75%以上の脂質を含む高脂質ゲルの報告は過去に無い。

本研究では、脂質を 75%以上含む高脂質ゲルにおける最適な乳化剤および水溶性高分子ゲル化剤の検討を行った。

【方法】脂質としては消化吸収がよくエネルギーになりやすい MCT オイル（中鎖脂肪酸油）を用いた。また乳化剤およびゲル化剤を併用してゲル状にすることにより、嚥下性の改善とともに脂質の分散安定性の向上を試みた。水に乳化剤を溶解し、攪拌機を用いて攪拌しながら徐々に油を投入した。この得られた乳化物を攪拌しながらゲル化剤を添加し、85℃以上で 5 分間加熱後水冷した。生成したゲル化物を目視観察し、ゲル形成性を評価した。

【結果】脂質をできるだけ多く含むゲル状食品の作製手法を検討した結果、今回試料として使用した乳化剤およびゲル化剤の種類と添加量を最適化し、MCT オイルを最大 85%含むゲルを形成することができた。これはエネルギーが 7.65kcal/g となり、エネルギー補給食品として極めて有効である。乳化の型については、ゲル化剤が水溶性高分子のため、水相が連続相になる水中油型が適していると推測した。乳化粒子を均一な球状であると仮定すると最密充填は 74%（体積）であり、この値を超えるものは安定化が難しいとされている。このような水の含有量が少ない場合において、特にゲル化剤の種類と添加量を限定することで、安定したゲルを形成することができたと推察された。

gel, oil, food

講演番号：2B08p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B08 会場

高脂質ゲル物性の検討

The physical property of high oil containing gel

○松本 拓矩、中島 聡史、秋山 亜希子、増田 麻衣、渡邉 裕一、上田 佳宏（ソマール株式会社）
○ Takunori MATSUMOTO, Satoshi NAKAJIMA, Akiko AKIYAMA, Mai MASUDA, Yuichi WATANABE, Yoshihiro UEDA (SOMAR Corp.)

【目的】日本では超高齢化社会へと突入し、年齢を重ねて体力・嚥下能が低下した高齢者において、少量で必要とするエネルギー量を効率よく摂取し、低栄養状態を予防する高エネルギーゼリー状食品（高脂質ゲル）が求められる。脂質を最大 85%含有する高脂質ゲルについての物理的性質および安定性についての知見は過去に無く、実際の応用が難しい問題があった。
本研究では高脂質ゲルの物性（物理的特性、安定性）を評価し、高脂質ゲルの特性を明らかにした。

【方法】本高脂質ゲルは効率よくエネルギーを摂取し、かつ摂取しやすい形態であることを目的とし、脂質(MCT オイル：中鎖脂肪酸油)を最大 85%含む高脂質ゲル状食品である。したがって高脂質ゲルの物性評価は①高脂質ゲルの硬さ・付着性・凝集性などの物理的特性の評価および②高脂質ゲルの安定性の 2 点で評価した。①高脂質ゲルの物理的特性は脂質(MCT オイル)含有量を 20%から段階的に引き上げ、最大含有量を 85%とした高脂質ゲルを作製し、クリープメータ(山電株式会社製)にて硬さを評価した。②高脂質ゲルの安定性についてはゲル内部の乳化安定性および油脂分の分散安定を目視等の各種評価にて明らかにした。

【結果】高脂質ゲルの物理的特性を測定したところ、高脂質ゲルの硬さ・付着性・凝集性については脂質含有量とゲル化剤の種類が関連していることが明らかになった。さらに本高脂質ゲルの安定性を検証するため冷蔵庫(5℃)にて保存したところ、目視でのクリーミング・凝集・離油はほとんど見受けられない。脂質を高濃度に含有しているにも関わらず、乳化安定性を有することが明らかになり、安定性にはゲル化剤の種類が影響することが示唆された。

gel, oil, food

講演番号：2B08p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B08 会場

アニオン界面活性剤を用いた卵黄汚れの除去機構解明
Elucidation of the removal mechanism of egg yolk grime using anionic surfactant
○横山 実[1]、鈴木 政宏[1]、真砂 賢次[2]、鈴木 不律[1]、西澤 伸広[1] ([1]花王株式会社　ハウスホールド研究所　、[2]花王株式会社　解析科学研究所)
○ Minoru YOKOYAMA[1], Masahiro Suzuki[1], Kenji Manago[2], Furitsu Suzuki[1], Nobuhiro Nishizawa[1] ([1]Kao Corp. Household Product Res., [2]Kao Corp. Analytical Science Res.)

【背景・目的】
日々の生活で発生する汚れは多岐に渡るが、食器をはじめとした硬質表面に固着した卵黄は非常に除去が困難であることが知られている。卵黄には granules phase と plasma phase と呼称される、2 つの相が存在している。granules phase は 2 種類のリポタンパク質 High Density Lipoprotein (HDL)、Low Density Lipoprotein (LDL)と phosvitin が強固な複合体として存在している一方、plasma phase は LDL と複数の遊離タンパク質が水中に分散しており、2 つの相は成分、構造ともに大きく異なっている。本研究では、このように除去が困難とされている卵黄に対して有効な基剤を探索するとともに、その除去メカニズムを解明することにより、卵黄除去技術の検討を行った。

【方法】
除去対象としてガラスプレート表面に固着した卵黄を用い、各種基剤の希薄水溶液に浸漬したモデルプレートの浸漬前後の質量変化より評価を行った。また、卵黄は遠心分離 (10000×*g*, 45 min, 4℃) により 2 つの相に分画した。各相への有効性評価には動的光散乱法による粒子径の変化及び Scanning Transmission Electron Microscope (STEM)を用いて行った。

【結果】
浸漬除去評価の結果、炭素数 10 のアルキル硫酸塩 (C10AS) が卵黄汚れに対して高い除去効果を示すことが明らかとなった。動的光散乱による粒子径測定の結果、C10AS の浸漬前後で粒子径が変化せず、granules 部への効果が低いことが示唆された。一方、plasma 部の STEM 観察の結果からは、主成分である LDL の形状が作用前後で大きく変化している様子が観察された。これらの結果から C10AS の高い除去効果は、卵黄を構成する 2 つの相のうち特に plasma 部への作用によるものであることが推定された。

egg yolk, removal, anionic surfactant

講演番号：2B08p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B08 会場

ナス果実に含まれるコリンエステルと含量

Choline ester and content in eggplant

○松本 健督[1]、和具 なおみ[2]、鈴木 美穂[1]、鈴木 綾子[1]、宮武 浩二[3]、高橋 昭彦[4]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]信州大農・技術補佐員、[3]農研機構、[4]高知県農業技術センター)
○Kento Matsumoto[1], Naomi Wagu[2], Miho Suzuki[1], Ayako Suzuki[1], Koji Miyatake[3], Akihiko Takahashi[4], Kozo Nakamura[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ,technical assistant, [3]Agricultural Research Center, [4]Kochi Prefectural Agricultural Technology Center)

【背景・目的】　我々は、多くの食品中にコリンと有機酸がエステル結合したコリンエステル類（アセチルコリン：ACh、プロピオニルコリン：PrCh、ブチリルコリン：BuCh、ラクトイルコリン：LaCh など）が存在し、高血圧自然発症ラット（SHR）で降圧作用を引き起こすことを明らかにした。コリンエステル類は食経験があるため安全性が高いと考えられ、高血圧予防・改善を目的とした新たな食品機能性成分として期待できる。農産物では、きゅうり、きゃべつ、ぶどうなどの研究室で調査した生鮮農産物（19 種類）全てに ACh が含まれており、特に、ナスには、他の農産物の数百倍以上の ACh が含まれていた。そこで、ナス乾燥粉末を用いて SHR への単回および反復経口投与試験を行ったところ、降圧作用および血圧上昇抑制作用が認められた。本研究では、ナス中のコリンエステル類組成を明らかにすると共に部位や品種などの ACh 含量変化を調査したので報告する。
【方法】　ナスサンプル凍結乾燥粉末の振とう抽出溶液を、陽イオン交換カートリッジで固相抽出した後、溶出液中の ACh を LC-MS/MS 多重反応モニタリング（MRM）モードを用いて標準添加法で定量した。また各コリンエステルの定量値は、内部標準物質（(2-aminoethyl)trimethylammonium pivaloylamid）の回収率から、サンプル調製ロスを補正した。ナス果実のコリンエステル組成研究には千両 2 号（2015.10 入手)、ナス果実 ACh 分布調査には千両 2 号（2017.7 入手)、ナス果実 ACh 含量変化調査にはヒゴムラサキ（2015.11 入手)、ナス果実中 ACh 含量の品種間差調査には、農研機構野菜花き研究部門、高知県農業技術センター、タキイ種苗（株)、藤田種子（株）から提供されたナス果実（2017.6～10 入手）を用いた。
【結果】　ナス（千両 2 号）には、ACh、PrCh、BuCh が含まれており、ACh が 99.8%を占めていた。ACh はナスの果肉に多く存在し、果皮や萼片の含量は低かった。ナス果実の ACh 含量は、受粉から収穫までの期間と正の相関が見られた。本研究で定量した全品種のナス果実に ACh が含まれていたが、含量にはばらつきがあった。常温保存では、ナス果実 ACh 含量は緩やかに減少し、ナス果実中で ACh は比較的安定であった。ナスは栄養成分が乏しいと考えられてきたが、コリンエステルを有効成分とする機能性食品素材として活用できる可能性がある。
なお、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

Eggplant, Cholinester, Acetylcholine

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B08p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B08 会場

コリアンダー（*Coriandrum sativum* L.）葉茎部における抗酸化活性を指標とした含有成分の解明

Elucidation of constituents in Coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves and stem based on antioxidant activities

○小原 理加[1]、恩田 浩幸[2]、佐川 岳人[2]、菊﨑 泰枝[3]([1]奈良女子大院・食物栄養、[2]エスビー食品(株)、[3]奈良女子大・生活環境・食物栄養)
○Rika OHARA[1], Hiroyuki ONDA[2], Takehito SAGAWA[2], Hiroe KIKUZAKI[3] ([1]Grad. Sch. of Nara Women's Univ., [2]S&B Foods Inc., [3]Nara Women's Univ.)

［目的］コリアンダー（*Coriandrum sativum* L.）は地中海地方原産でセリ科の植物である。本研究で用いた葉はパクチーとも言われ独特の香りを有し、エスニック料理に使用されることが多い。近年、市場ではコリアンダーを使った商品が数多く販売されており、日本でも注目されている食材である。

先行研究により、コリアンダーの脂溶性抽出物及び水溶性抽出物は、多くのカロテノイドやフェノール性化合物を含み、脂質過酸化に対して強い抑制を示すことが分かっている。また、本研究室においても食品の抗酸化能の統一指標である AOU を測定した結果、抗酸化能を有することが確認された[1)]。しかし、コリアンダーの含有成分についての情報はまだ少ない。そこで、今回は抗酸化活性を指標として、コリアンダー中に含まれる成分の分析を行った。

［方法］生のコリアンダー（葉+茎、葉、茎、根）を 70%含水アセトンで抽出した後、ヘキサン可溶部、塩化メチレン可溶部、酢酸エチル可溶部、水可溶部に分画した。水可溶部はさらに、MCI gel を用いたオープンカラムクロマトグラフィーによって水溶出物及びメタノール溶出物に分離した。DPPH ラジカル捕捉活性測定法、ORAC 法、Folin-Ciocalteu 法、SOAC 法を用いて各分画物の抗酸化能を測定した後、HPLC でモニタリングしながら ODS gel 等を用いたオープンカラムクロマトグラフィーにより、抗酸化活性が確認された画分中の成分の分離を行った。単離した化合物について LC-MS/MS 及び、NMR によって構造解析を行った。

［結果］抗酸化能を測定した結果、葉茎部の酢酸エチル可溶部およびメタノール溶出物の効力が高いことが分かった[1)]。両画分の HPLC クロマトグラムが類似していたため、収量の多いメタノール溶出物に着目した。オープンカラムクロマトグラフィーで分離した結果、HPLC クロマトグラムのパターンから 61 のフラクションに分画した。フラクション 50 から Quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide、フラクション 56 から Rutin を単離、同定した。また、メタノール溶出物中では、Rutin の含有量が最も多いことが分かった。現在、他の単離化合物についても LC-MS/MS 及び NMR によって構造解析を行っている。

1）小原理加ら　第 32 回日本香辛料研究会学術講演会

Coriandrum sativum L., antioxidant, flavonoid

講演番号：2B08p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B08 会場

味噌中の腸内炎症性物質（LPS）消去作用について

Studies on elimination of intestinal inflammatory substance in Japanese miso

○金内 誠、山内 唯、石子 彩夏（宮城大 食産）
○Makoto KANAUCHI, Yui YAMAUCHI, Ayaka ISHIKO (Miyagi Univ.)

【緒論】腸内は、腸内細菌であるグラム陰性菌の持つ LPS（リポポリサッカライド）によって炎症を誘発することが知られている。このような LPS に対する消去タンパク質として牛乳の中のラクトフェリンが知られている。しかし、日本人の多くは、牛乳に含まれる乳糖への耐性がなく（乳糖不耐症）、乳を多く摂取できないのが現状である。そこで、乳の代わり手軽に摂取できる LPS 無毒化タンパク質／ペプチドを求めることが必要である。ところで、発酵食品の摂取によって、腸内の炎症性疾患が改善されるとの報告がある。また、大豆のトリプシンインヒビターには、LPS 刺激を抑制し、炎症系のサイトカインを抑制するとの報告もある。特に大豆を原料とし、発酵食品でもある味噌は、胃潰瘍予防効果や消化促進、整腸作用など様々など、胃腸に対する機能性も報告されている。これは、発酵食品中微生物だけでなく、新たに生成されたペプチドなどの成分なども作用すると考えられている。

そこで、本研究では、大豆の LPS 消去能に着目し、地域や原料配合などによってタイプの異なる味噌 28 種類を用い、ラクトフェリン様活性（LPS 消去活性）を持つものをスクリーニングし、LPS 消去活性物質を検討することとした。

【実験方法】味噌試料(28 種類)は、色彩色度計によって測定し、色調による分類を行った。試料（0.5g）は、pH 7.0 となるように調製後、滅菌水にて 50mL に定容後にろ過し、試料溶液とした。消去活性は、試料溶液（150 μL）に 50 μL LPS 溶液 を作用させ、測定した。残存 LPS 量測定は、リムルスカラーKY テストワコーを用いた。また、試料溶液の代わりに水を用いたものを対照とし､LPS 消去率を求めた｡Bleu Native-PAGE は､Native PAGE Novex、3-12% Bis-Tris Protein Gels (ライフテクノロジー社)を用いた。泳動緩衝液は Native PAGE Running Buffer 及び Native PAGE Cathode Buffer Additive (ライフテクノロジー社)を用い、150V、100 分で泳動を行った。さらに、ゲル中の各タンパク質バンドはメスで切り出し、ゲルの重量を測定後、注射用水で 2 回ずつ洗浄した。その後、LPS 溶液（0.1μg/mL）400μl と 15℃、24 時間反応させた。

【結果及び考察】味噌試料のホルモール窒素を測定したところ、秋田味噌のホルモール窒素量が 0.74%と高く、沖縄の薬膳味噌（0.16%）や白味噌（0.2%）のホルモール窒素量は低いものであった。また、LPS 消去率が高いのは、長期熟成の信州みそで、85%の LPS を消去した。次いで津軽味噌、五穀味噌、仙台味噌で、LPS 消去率は 63～65%であった。味噌の色調とホルモール、LPS 消去活性には相関はなかった。しかし、ホルモール窒素量が 0.30～0.50%程度の味噌は LPS 消去率が高く、タンパク質分解が関係すると考えられた。長期熟成の信州味噌の高分子タンパク質に LPS 消去活性を持つタンパク質が確認することができた。よって、味噌は LPS 消去タンパク質を持つことが示唆された。

miso, lipopolysaccharide, elimination

発表責任者：金内 誠（kanauchi@myu.ac.jp）

講演番号：2B08p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B08 会場

阿波晩茶の発酵過程において pH およびポリフェノールが微生物の生育に及ぼす影響

Effects of pH and phenolic compounds on growth of microorganisms during fermentation period of Awabancha

○小山 翔大[1]、大渕 明日香[2]、内野 昌孝[2,3]、高野 克己[2]([1]東京農大院農化、[2]東京農大応生、[3]東京農大生命)
○Shota KOYAMA[1], Asuka Ofuchi[2], Masataka UCHINO[2,3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Lifesci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 阿波晩茶は後発酵茶で徳島県の特産品のひとつである。この阿波晩茶は茶葉を水煮し、桶に詰め、重石を乗せて 3 週間ほど発酵させた後、天日干しを経て製品となる。この嫌気的な発酵過程で酸味など独特の風味が付与され、緑茶および紅茶とは異なる風味を特徴をとする。阿波晩茶はスターターを用いず、自然発酵にて製造されているため、同一生産者であっても、年度や桶ごとに製品にややばらつきがみられる。我々はこれまでに発酵過程の微生物および成分を分析し、pH の低下が確認された桶では、比較的ポリフェノール量が高く、乳酸菌は *Lactobacillus* 属が優勢で、一般生菌数が抑制される関係が確認されたことを報告した。本報告では、微生物の制御に寄与すると推察された pH およびポリフェノールと微生物の生育との関係性ついて検証した。
【方法】 試験には 2016 年に製造された阿波晩茶の発酵液より単離した乳酸菌（*L. pentosus*、*L. fermentum*、*L. coryniformis*、*Weissella paramesenteroides*、*Lactococcus lactis*）およびその他の細菌（*Chryseobacterium* 属、*Acinetobacter* 属、*Comamonas* 属、*Lysinibacillus* 属 ）を用いた。生育 pH 試験では、GYP 液体培地または YM 液体培地に乳酸を添加し pH を調整した。ポリフェノール耐性について、市販の粉末緑茶より調製した茶浸出液を Sep-pak C18（Waters 社）に供しポリフェノールを除去し、サンフェノン EGCg-OP（太陽化学：エピガロカテキンガレートを 90%以上含有）を添加し試験を行った。両試験とも、ろ過滅菌した後、前培養した乳酸菌または一般生菌を添加し、30℃または 37℃、72 時間の条件で静置培養した。培養液を MRS 白亜寒天培地または標準寒天培地へ塗抹後、72 時間培養し、コロニー形成の有無を確認した。また、培養液の pH または総ポリフェノール量（Folin-ciocaluteu 法）を測定した。
【結果および考察】生育 pH 試験の結果、*Lactobacillus* 属および *W. paramesenteroides* の乳酸菌は pH3.5-6.0、*L. lactis* は pH4.0-6.0 の範囲での生育が確認された。pH が最も低い桶は pH4.89 であり、何れの乳酸菌も阿波晩茶発酵液にて検出された pH の範囲では生育が阻止されなかったことが示唆された。また、その他の細菌は、低 pH で生育が抑制される傾向を示した。ポリフェノール耐性試験の結果、乳酸菌では、*L. pentosus* は 9.0mg/ml においても生育がみられ、高いポリフェノール耐性を示したが、*L. lactis* は耐性が最も低いことがわかった。その他の細菌は乳酸菌と比較して、ポリフェノールによる生育抑制効果が高い傾向が確認された。これらの結果より、発酵液中のポリフェノール量を調節することで、発酵過程での菌叢を制御し、安定した品質の阿波晩茶を生産できる可能性が示唆された。

Post-fermented tea, phenolic compounds, lactic acid bacteria

講演番号：2B08p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟南 B08 会場

考古化学的視座による食品とその炭化物の化学分析

The chemical analysis on food and charred food residue from the perspective on archaeological chemistry

○大道 公秀[1]、橘田 規[2]、奥脇 早紀[1]、種 あやめ[1]、西念 幸江[1]、椎野 博[3]、清水 文雄[3]、三舟 隆之[1]([1]東京医療保健大学、[2]日本食品検査、[3]アワーズテック)
○Kimihide Ohmichi[1], Tadashi Kitta[2], Saki Okuwaki[1], Ayame Tane[1], Sachie Sainen[1], Hiroshi Shiino[3], Fumio Shimizu[3], Takayuki Mifune[1] ([1]Tokyo Healthcare University, [2]Japan Foods Inspection Corporation, [3]Ourstex corporation)

【背景・目的】考古学・文化財科学分野では、土器内面及び口縁部に付着している黒色物質を、食品を煮炊きしてできた炭化物と推定し、その化学分析により、土器に使用された食材の推定が試みられている。しかし、土器試料の分析から、古代食の類推を行うためには、そもそも前提となる情報として、調理前後における化学変動に関する考察が必要である。そこで、食品炭化物分析を通じて調理前後の各種化学変動を調べてきている。5 種類の食材を対象に炭素・窒素の安定同位体比の変動を調べたところ、調理前後で若干の変動は見られたが、「食品群」を超えるほどの変動は、確認できなかった。我々は、この他の各種理化学分析も用いて食品炭化物の物理化学的特性を明らかにしつつ、各種分析手法の結果を考え合わせて、炭化物の起源の推定を目指したいと考えている。
【方法】3 種類の食材（タイ，コメ，ワカメ）の可食部を試料とした。これらを土鍋で、ゆでて、さらに煮汁を煮詰め、土鍋底部に炭化物を得た。この炭化物を蛍光 X 線分析、FT-IR 分析、ラマン分光分析、C/N 比分析、ステロール分析を行った。C/N 比分析、ステロール分析は、調理前食材とその煮汁についても分析を行った。ステロール分析は試料をアルカリ加水分解後、石油エーテルにより抽出し、濃縮後 LC-MS/MS により分析した。
【結果及び考察】蛍光 X 線分析の結果からは、炭化物部位が素地と比較して、Na、P、K、Ca の組成割合が高くなり、食品炭化物の痕跡を示した。FT-IR 分析ではタイのコゲより 1800～1600 cm^{-1} 付近ショルダー部に「焦げ」由来と考えられるカルボニル基に起因する吸収が確認できた。ラマン分光分析でも同様に、カーボンの存在を示す 1590 cm^{-1} 付近の G-band と 1350 cm^{-1} 付近の D-band のピークを確認できた。C/N 比分析では、炭化により炭素の組成割合が増えることを確認した。また調理前，炭化物ともに C/N 比の値はコメ＞ワカメ＞タイであった。これは食材由来の窒素（アミノ酸）の影響を受けていると考えている。ステロール分析では、食品の種類によってステロール類の溶出度合い・残留度合いが異なっていた。ワカメの場合、三陸産生ワカメからフコステロール 67 μg/g（水分 92%）検出されたが、その煮汁では 1.5 μg/g となり、炭化物ではさらにそれを下回る。各種炭化物分析の結果から得られた知見を考え合わせて、引き続き食材類推方法の確立を目指していきたい。
【謝辞】本研究は JSPS 科研費 No. 17H02393 助成の一部を受けて行われた。

paleo diet, charred residue, archaeological chemistry

発表責任者：大道公秀（k-ohmichi@thcu.ac.jp）

講演番号：2B08p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B08 会場

LC-MS/MS による高感度マイコトキシン一斉分析手法の開発

The development of sensitive multi-mycotoxin analysis by LC-MS/MS

○井本 英志[1]、望月 直樹[2]、渡辺 淳[1] ([1]島津製作所、[2]横浜薬科大学)
○ Eishi IMOTO[1], Naoki MOCHIZUKI[2], Jun WATANABE[1] ([1]Shimadzu Corp., [2]Yokohama University of Pharmacy)

マイコトキシン（カビ毒）は，主に穀物・香辛料などの輸入品や試料などに付着したカビが産生する毒素である。人体や家畜への急性毒性や発がん性が報告されており，国内外で食品や飼料の汚染実態調査，毒性評価，基準値設定が求められている。昨今，食品安全の立場から原材料のマイコトキシンの自主検査が増加しており，基準値・規制については各国・地域で設定されているが，対象となっているマイコトキシンは共通の成分である。従来から様々なマイコトキシンの分析方法が開発されてきたが，前処理も分析条件もマイコトキシンの種類毎に異なるため，選択性と感度に優れた LC-MS/MS による分析が注目を浴びている。各マイコトキシンを個別に測定するには膨大な時間が掛かるため，効率的かつ厳密な分析が実現可能な LC-MS/MS を用いたマイコトキシンの迅速一斉分析法の開発を行った。

今回，複数の洗浄液を用いて洗浄可能なオートサンプラを有する HPLC（Nexera X2, Shimadzu）および高速に極性切り替えすることで正/負のイオンを同時に検出できるトリプル四重極型質量分析計（LCMS-8060, Shimadzu）を用いてアフラトキシン類，トリコテセン系カビ毒，フモニシン類，ゼアラレノン，オクラトキシン A の高精度かつ高感度な迅速一斉分析法を確立することに成功した。また，トリコテセン系カビ毒である 3-アセチルデオキシニバレノールおよび 15-アセチルデオキシニバレノールを分離するために PFP カラム（Mastro™ PFP2, Shimadzu GLC）を用いた。ステンレススチールのカラムボディー内面をポリマーでコーティングしているため金属キレート性があると言われているフモニシン類の分析に対しても有効である。洗浄液は疎水性化合物に対して洗浄能力が高いイソプロパノール，メタノール，アセトニトリル，ギ酸水溶液の 4 液混合液と金属とキレート形成し，対象化合物の吸着を抑制可能なクエン酸ナトリウム水溶液を用いた。

米・小麦などの穀物類に対して多機能カラムを用いて前処理を行い，抽出液に各マイコトキシンの標準液を段階的に添加した。構築した一斉分析法を用いて LC-MS/MS にて測定を行ったところ，共雑成分の影響を受けず，検量線の直線性および再現性良く，高感度に検出することができた。また定量下限値は各国で規制されているマイコトキシンの規制値を大幅に下回った。

以上の結果より今回開発した一斉分析手法は高速（分析時間 15 分）かつ高感度でマイコトキシンを分析可能な有効な手段である。

LC-MS/MS, Mycotoxin

発表責任者：井本 英志（imoei@shimadzu.co.jp）

講演番号：2B08p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B08 会場

LC-MS を用いた穀物中のトリコテセン系カビ毒の一斉分析

Simultaneous analysis of trichothecenes in grains by using LC-MS

○佐野 勇気[1]、高橋 洋武[1]、橘田 規[1]、佐藤 信彦[1]、照井 善光[1]、望月 直樹[2] ([1]日本食品検査、[2]横浜薬科大学)
○Yuki SANO[1], Hirotake TAKAHASHI[1], Tadashi KITTA[1], Nobuhiko SATO[1], Yoshimitsu TERUI[1], Naoki MOCHIZUKI[2] ([1]JFIC, [2]Yokohama University of Pharmacy)

【目的】

Fusarium 属菌が産生するトリコテセン系カビ毒は、麦、トウモロコシなどの穀物を汚染することで知られており、世界中で健康危害が報告されている。この中で毒性が強いとされている化合物には、ニバレノール（NIV）、デオキシニバレノール（DON）、フザレノン X（FX）、3-アセチルデオキシニバレノール（3-AcDON）、15-アセチルデオキシニバレノール（15-AcDON）、ネオソラニオール（NEO）、ジアセトキシスシルペノール（DAS）、HT-2 トキシン（HT2）、T-2 トキシン（T2）があり、これまでに国際的に食品の汚染実態が調査されており、わが国においても法整備が求められている。今回、LC-MS を用いたトリコテセン系カビ毒の迅速一斉分析法を開発した。本条件の妥当性を評価し、市販の穀物および加工食品を対象に実態調査を行ったので報告する。

【方法】

種々の検討により測定条件および前処理条件を設定した。小麦を対象試料とし、CODEX Procedural Manual に示された分析法の妥当性評価ガイドライン[1)]に従い、本条件の妥当性評価を実施した。また、市販の小麦、乾燥とうもろこし、パスタ、パンを対象として実態調査を行った。標準品は関東化学製を用いた。

【結果および考察】

検討の結果、全ての対象分析種が 10 分以内に溶出する迅速分析条件を確立した。妥当性評価は、真度、精度、選択性、検量線の直線性などで良好な結果が得られた。また市販食品からは、NIV、DON および 15-AcDON などが検出され、特に乾燥とうもろこしでは毒性が高いと言われている DON が 50 ppb 程度検出された。これはただちに健康危害を及ぼすレベルではないものの、市販食品におけるカビ毒の汚染実態が示された。今後はさらに対象試料を拡張し調査する予定である。

1) *PROCEDURAL MANUAL* Twenty-fifth edition, CODEX.

trichothecenes, high resolution accurate mass spectrometry, lc-ms

発表責任者：橘田規（t_kitta@jffic.or.jp）

講演番号：2B08p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B08 会場

補糖及び補酸によるワイン中の水の酸素安定同位体比への影響
Effects of chaptalization and acidification on oxygen stable isotopic composition of water in wine
○赤松 史一、清水 秀明、鎌田 綾、藤井 力、後藤 奈美（酒類総研）
○ Fumikazu AKAMATSU, Hideaki SHIMIZU, Aya KAMADA, Tsutomu FUJII, Nami GOTO-YAMAMOTO (Natl. Res. Inst. Brew.)

【背景】
2018 年 10 月から、国産ブドウを原料とした国内醸造ワインを日本ワインと呼称できる地理的表示制度が開始される。日本ワインの偽装表示防止には、表示を担保するための科学的判別手法が必要とされており、科学的判別手法は日本ワインの商品価値の向上と消費者保護への貢献が期待されている。酸素安定同位体比分析は、主要な産地判別技術の一つであり、様々な食品で応用研究が進められている。日本ワインにおいても強力な判別技術となる可能性があるが、日本ワインの酸素安定同位体比（δ^{18}O）の変動要因は不明な点が多い。本研究では、醸造工程におけるワイン中の水の δ^{18}O 値の変動要因を明らかにするため、ワイン醸造工程の主要な操作の一つである補糖と補酸によるワイン中の水の δ^{18}O 値への影響について検証を行った。

【方法】
白ワイン用ブドウの主要品種であるシャルドネと赤ワイン用ブドウの主要品種であるカベルネ・ソーヴィニヨンの濃縮還元果汁を原料として、補糖（ショ糖添加）、補酸（酒石酸添加）、補糖と補酸（ショ糖と酒石酸添加）、対照（無添加）の 4 処理を行ったワインの小規模醸造試験を実施した。発酵終了後、各処理区のワイン中の水の δ^{18}O 値を測定し、補糖、補酸によるワイン中の水の δ^{18}O 値への影響を検証した。

【結果と考察】
ワイン中の水の δ^{18}O 値は、発酵によってブドウ果汁の酸素安定同位体比から 1.2±0.2‰（平均±標準偏差）高くなったが、4 つの処理区間に有意差はなく、補糖、補酸によるワイン中の水の δ^{18}O 値への直接の影響は検出されなかった。一方で、エタノール収率が低くなるほどワイン中の水の δ^{18}O 値が高くなることが明らかになった。エタノール収率の低下は、呼吸やエネルギー消費など、アルコール発酵以外の酵母の代謝が増加したことを示唆する。酵母の代謝によって生じたブドウ果汁の有機物に由来する高い酸素安定同位体比を持つ水の流入が、ワイン中の水の δ^{18}O 値の上昇に寄与した可能性がある。本研究で得られた知見は、酸素安定同位体比分析を用いた日本ワインの産地判別技術に寄与することが期待される。

fermentation, oxygen stable isotopes, wine

講演番号：2B08p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B08 会場

微生物による食品由来メイラード反応生成物の分解およびその作用機構の解析

characterization of food-derived melanoidins using microbiological degradation activity

○田野 孝一、油井 拓哉、島村 裕子、増田 修一、大橋 典男 (静岡県立大学)
○ Koichi TANO, Takuya YUI, Yuko SHIMAMURA, Syuichi MASUDA, Norio OHASHI (University of Shizuoka)

【目的】メラノイジンは食品加工や貯蔵過程におけるメイラード反応によって生成する褐色ポリマーであり、主にコーヒー、パン、醤油等の食品に含まれている。メラノイジンには、抗酸化作用等の生理活性があり、生活習慣病の予防など、健康維持に役立つことが期待される。しかし、メラノイジンは、高分子化合物でその化学構造が未解明であることから、これら機能性の発現機構の解明には至っていない。高分子化合物であるメラノイジンの構造解析の手法として、低分子化した断片を解析する方法が挙げられるが、強酸・強アルカリによる加水分解や酸化・還元反応では、元の化学構造が失われる可能性がある。そこで本研究では、メラノイジン分解活性を有する微生物を利用し、温和な反応条件化で分解を行い、メラノイジンの部分構造およびその生理活性の発現機構について明らかにすることを目的とした。
【方法】メイラード反応生成物として、グルコースとグリシンを 90～95℃で 1 時間加熱したモデル系メラノイジン（MM)、市販のパン粉を加熱後（260℃)、粉砕して水で抽出したベーカリー由来メラノイジン（BM）の非透析画分を調製した。調製した MM および BM に対する脱色能（波長 500 nm）を指標に、沖縄県の宮古島等から分離したメイラード反応生成物の分解能を有する微生物（5 菌株）を用いてメラノイジン分解能を評価した。また、メラノイジン分解能の最適パラメーターについて明らかにするために、異なる培養条件下における分解能の違いを調べた。さらに、微生物分解前後の MM および BM の抗酸化性（DPPH ラジカル消去活性試験）および抗変異原性（Ames 試験）について評価した。
【結果・考察】分離した微生物のメラノイジン最大脱色率は、MM で約 32%、BM で約 64%だった。最適なメラノイジン分解条件を検討したところ、BHI および MRS 培地では嫌気培養、GYP 培地では好気・静置培養条件下において BM の最大脱色能を示した。また、BM と MM では最適なメラノイジン分解条件が異なっていたことから、メラノイジンの種類により、微生物による分解機構が異なることが示唆された。微生物分解前後の MM および BM の抗酸化性を調べたところ、分解前と比較して各々抗酸化性が上昇しており、分解後の生成物が抗酸化能の増強に寄与していることが推察された。微生物分解前の MM および BM に変異原性は認められなかった。現在、分解前後の MM および BM における抗変異原性について検討しており、また、分解後のメラノイジンの分子量についても、ゲル濾過カラムを用いた HPLC-DAD 解析によって調べている。

Maillard reaction, Food melanoidins, Microbiological degradation

講演番号：2B08p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B08 会場

原料大麦の違いが麦茶品質に及ぼす影響

Effect of difference of barley grain on Brix, color and flavor of the roast barley extract

○神山 紀子、金子 成延、青木 恵美子、柳澤 貴司（農研機構・作物開発センター）
○Noriko Kohyama, Shigenobu Kaneko, Emiko Aoki, Takashi Yanagisawa (NARO NICS)

【背景・目的】麦茶は大麦を原料とし、焙煎、抽出することによって得られる飲料である。麦茶の品質は色、香、味で評価されるが、焙煎工程の違いで大きく変わるため、原料である大麦の違いがどの程度影響しているのかは不明である。そこで、品種や栽培地が異なる 5 種類の大麦を、3 社の麦茶メーカーで試験焙煎した麦茶粒の計 15 試料を用いて、原料の違いによる麦茶抽出液の品質の差異を明らかにすることを目的とした。
【方法】予備試験として、大麦 50ｇをコーヒー焙煎機で 3 段階に焙煎し、焙煎度の異なる麦茶粒を調製した。平成 28 年産の品種、栽培地が異なる大麦 5 種類を 3 社の麦茶メーカーでそれぞれ最適な焙煎度に試験焙煎した麦茶粒を得た。麦茶粒 1.25ｇに沸騰した蒸留水 45ml を加え、撹拌しながら 105℃で 30 分間加熱した後冷却し、コーヒーフィルターで濾過した濾液を麦茶抽出液とした。麦茶抽出液は可溶性固形分の指標として Brix を、水色の指標として 440nm の吸光度を測定した。麦茶の香気成分は、麦茶抽出液 1ml を蒸留水で 5 倍に希釈した試料のヘッドスペースガスを SPME 法で抽出し、GCMS で分析し、予め 27 種の標準化合物混合液で作成した検量線を用いて、各成分の濃度を算出した。分析は 4 反復で行い、23 成分の濃度を用いて主成分分析を行った。
【結果と考察】同一原料を段階的に焙煎した場合、深煎り程、麦茶抽出液の Brix と吸光度が高かった。一方、香気成分は furfural や 5-methylfurfural は深煎りの麦茶抽出液に多いのに対し、trimethylpyrazine や 2-furanmethanol では中煎りに多く、成分により挙動が異なった。麦茶メーカーで焙煎された 15 試料の麦茶抽出液では、Brix と吸光度の間に有意な相関が見られた。3 社に共通して Brix と吸光度が低い原料もみられたが、原料間の順位はそれぞれ異なっていた。麦茶抽出液の香気成分の中では、furfural、5-methylfurfural、2-furanmethanol 等 3 社に共通して多い原料と少ない原料が見られたが、原料ごとに一致した挙動を示さない成分も多かった。香気成分の主成分分析の結果、第 1 主成分は原料の影響が大きく、第 2 主成分は麦茶メーカーの影響が大きかった。以上により、麦茶抽出液の品質には、焙煎工程の違いだけでなく、原料である大麦の違いが反映されることが示唆された。

roast barley, flavor, barley grain

発表責任者：神山紀子（norikok@affrc.go.jp）

講演番号：2B08p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟南 B08 会場

新規開発酒米「栃木酒 27 号」の栽培条件の検討と醸造特性の解析
Investigation of cultivation conditions and characterization for sake making of novel sake rice, Tochigi-sake 27

○矢澤 彌[1]、高橋 正之[1]、小林 拓嗣[1]、伊澤 由行[2]、竹内 菜央子[2]、菅谷 和音[2]、粂川 晃伸[2]、杉本 琢真[3]、岩下 和裕[1] ([1]酒総研、[2]栃木県農試、[3]兵庫県農総セ)
○Hisashi YAZAWA[1], Masayuki TAKAHASHI[1], Takuji KOBAYASHI[1], Yoshiyuki IZAWA[2], Naoko TAKEUCHI[2], Kazune SUGAYA[2], Terunobu KUMEKAWA[2], Takuma SUGIMOTO[3], Kazuhiro IWASHITA[1] ([1]Nat. Res. Inst. Brewing, [2]Tochigi Pref., [3]Hyogo Pref.)

【目的】山田錦は、その醸造特性の良さから現在最も生産されている酒米であるが、耐病性の低さや倒伏しやすいといった栽培上の問題があり、各地で新品種の育種が行われている。栃木県においても山田錦を親株として、栽培上の問題を克服した県独自の酒米品種の育種が進められ、縞葉枯病耐性、耐倒伏性を有する栃木酒 27 号が開発された。本研究では、栃木酒 27 号の醸造特性を調べるとともに、栽培条件と酒米品質との関連について解析を行った。
【方法】栽培条件の検討については、基肥量(0.3, 0.5, 0.7kg/a)と追肥時期(出穂 22、15 日前)、栽植密度(11.2、15.2、22.2 株/m^2)、栽培地(県内 8 か所)を変えた栽培を山田錦をコントロールとして実施した。収穫された全サンプルについて酒米統一分析を、施肥条件を変えたものについて試験精米（70%、50%)、ラボレベルの製麹、小仕込(総米 100g)を実施し、麹の酵素力価、発酵経過分析、一般成分、香気成分、メタボローム分析を行った。さらに、40%精米の両サンプルで、同じ製麹操作、仕込み、制御によりプラントスケールの仕込(総米 100kg)を実施し、各種分析及び官能評価等を行った。
【結果】栽培条件の影響に着目すると、玄米の青米含量が基肥量の増加と早い追肥時期の組合せで増加する傾向が見られた。酒米統一分析の結果では、粗タンパク質及びカリウムは施肥量に応じ増加したが、栽培地による変動の方が大きかった。また、栽植密度が高くなると 20 分、120 分、蒸米の各吸水率とも減少する傾向が見られた。製麹試験では、70%精米で施肥量が増えると酵素活性が高くなる傾向が見られたが、50%ではその差は小さかった。興味深いことに、小仕込製成酒についても 70%精米では、施肥量に応じて酸度、アミノ酸度が高くなったが、50%精米では顕著な違いは見られなかった。山田錦との比較では、栃木酒 27 号は吸水率が低くカリウムが高い傾向となった。精米特性については、山田錦と同等の結果であった。小仕込製成酒については 70%精米、50%精米とも栃木酒 27 号で日本酒度、アミノ酸度がやや高くなる傾向が見られた。また、50%精米ではカプロン酸エチルや酢酸イソアミル等の香気成分が山田錦より高かった。プラントレベルの仕込みでは山田錦と比較し、もろみの最高ボーメが低くなり、アミノ酸度については小仕込の結果と同様にやや高くなった。一方で官能評価については、後味が軽快なすっきりとした味わいとの評価が多く、総合評価は山田錦と同等であった。メタボローム解析の結果では、小仕込、プラント仕込とも旨味と柔らかな甘味を持つグルタミン及びグルタミン酸が多く、50%小仕込とプラント仕込では苦味に寄与するアルギニンが少なかったことから、これらの成分量が栃木酒 27 号の官能評価に影響していることが予想された。

Sake rice, Cultivation condition, Metabolomics

発表責任者：矢澤　彌（h.yazawa@nrib.go.jp）

講演番号：2B08p20
講演日時：3 月 16 日 17:59～ 共通講義棟南 B08 会場

ブドウ果実由来のフェノール性化合物が食品加工用酵素剤中の Polygalacturonase (PGase) 活性に及ぼす影響 (第 2 報)

Inhibitory effects of phenolic compounds in some table grapes on polygalacturonase activity of enzyme preparations for food processing.

○堀西 朝子、児玉 祥基、尾﨑 嘉彦 (近畿大学生物理工)
○Asako HORINISHI, Yoshiki KODAMA, Yoshihiko OZAKI (Kindai Univ.)

【目的】 微生物酵素を利用した果実類の剥皮加工技術は、適用できる樹種や品種が限定的である。演者らは、果実に含まれるフェノール性化合物による剥皮加工用酵素剤の活性阻害が剥皮性に影響しているのではないかと考え、果実由来フェノール性化合物による酵素活性の阻害作用について検討を行っている。これまでに、ブドウ主要品種を剥皮性により２つのグループに分類し[1)]、剥皮性が低い「ナイアガラ」の果肉のメタノール抽出物から得た画分が、Polygalacturonase (PGase)活性に強い阻害を示すことを報告している[2)]。本報告では、果肉および果皮の粗抽出物とカラムクロマトグラフィーで分画した画分について、果実類の剥皮加工に用いられている 2 種の酵素剤に対する阻害作用を６つの栽培品種間で比較し、剥皮性との関連を考察する。

【方法】 「巨峰」、「安芸クイーン」、「シャインマスカット」、「キャンベルアーリー」、「ナイアガラ」、「デラウェア」について、アクレモセルラーゼ KM (KM)およびプロトペクチナーゼ IGA (IGA) による剥皮性を確認した。またこれらの果実を果肉と果皮に分離し、それぞれの凍結乾燥粉末の水またはメタノール抽出物を得た。抽出物を合成吸着樹脂 Diaion HP20 カラムで分画し、酵素剤に含まれる PGase 活性に対する阻害作用を比較した。各画分のフェノール性化合物の総量は、Folin-ciocalteu 法、組成は HPLC 法で分析した。

【結果】 すべての品種の果皮抽出物に PGase 阻害作用が確認された。阻害作用の強さは品種により異なり、剥皮性の低い品種で、より強い阻害作用が示された。また、いずれの品種においても KM に比べ IGA に対する阻害作用が強いことが示された。一方、果肉抽出物では、顕著な阻害作用が認められたのは「ナイアガラ」のみであった。剥皮加工時の酵素液へのフェノール性化合物の溶出について検討する目的で、「デラウェア」果実を蒸留水に浸漬して得た浸漬液を分析したところ、果肉の水抽出物と類似した組成を示した。ところが、果肉の水抽出物の阻害作用は非常に低く、果皮由来の化合物が、浸漬液の阻害作用に大きく寄与していることが示唆された。果皮抽出物を Diaion HP20 カラムを用いて、吸着画分と非吸着画分に分画した場合、いずれの品種においても両方の画分にフェノール性化合物が含まれ、阻害作用が認められた。

【引用文献】

1)堀西朝子ら、日本農芸化学会大会講演要旨集 講演番号：3A04p02(2017).
2)児玉祥基ら、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大阪大会講演要旨集 p.126 (2017).

enzymatic peeling, grape, phenolics

講演番号：2B09p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B09 会場

クロロフィルの光退色に及ぼす凝集体形成の影響
Effect of formation of aggregates on light-discoloration of chlorophyll
○安田 みどり[1]、田端 正明[2]、豆野 博一[1]、梶原 健太[1] ([1]西九大健栄、[2]佐賀大理工)
○ Midori YASUDA[1], Masaaki TABATA[2], Hirokazu MAMENO[1], Kenta KAJIHARA[1] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Saga Univ.)

【目的】食品の色は、食材の鮮度や味わいを見分ける指標の一つである。クロロフィルは、緑黄色野菜や緑茶に含まれる緑色色素で、酸、熱、光に弱いとされている。特に、クロロフィルの光による退色は、食品業界では問題となっている。脂溶性のクロロフィルは、溶媒の違いにより溶存状態が異なることがわかっている。本研究では、溶液中のクロロフィルの緑色の保持を目的として、エタノール-水系においてクロロフィルの凝集性を利用して光退色を抑えることができるかについて検討を行った。
【方法】クロロフィルは、クロロフィル-a を用い、エタノールに溶解した。これを用いて、異なるエタノール濃度（10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 %, v/v）のクロロフィル溶液（最終濃度：1×10^{-5} M）を調製し、それぞれメンブランフィルター（800 μm）にてろ過を行った。サンプル溶液に UV（波長：336 nm、強度：0.7-0.8 mW/cm^2）を照射し、0、1、2、3、4、5 時間後にそれぞれ色差、UV-Vis スペクトルの測定を行った。クロロフィルの凝集体の粒径の測定は、動的光散乱式粒径分布測定システムを用いて行った。
【結果】クロロフィル溶液は、メンブランフィルターによるろ過により、30-50%エタノールではほとんど色がなくなった。UV 照射を行った結果、5 時間後にはエタノール濃度 60 %以上で著しい退色が生じたが、10-20 %エタノール溶液では緑色の保持が認められた。色差の a*値は、UV 照射前から比べると 5 時間後は 10、20 %エタノール溶液でそれぞれ 44、39 %残存していたが、それ以上のエタノール溶液では、残存率が低くなった。UV-Vis スペクトルを測定した結果、660 nm にクロロフィルのピークが認められたが、水の割合が増えるほど高波長側にシフトし、ブロードなピークとなった。このピークは UV 照射時間とともに減少したが、その減少率は 10、20 %エタノール溶液が他の溶液より低くなった。また、粒子径の測定から、10、20 %エタノール溶液中のクロロフィルの粒子径は、それぞれ 80、160 nm と他の溶液の場合よりも小さいことがわかった。一方、70 %以上のエタノール濃度では、粒子径が計測できなかったことから、これらの濃度ではクロロフィルは分散していることが示唆された。以上のことから、クロロフィルは、エタノール濃度が低い溶液中では、疎水性相互作用によりクロロフィル同士が集まり、小さな凝集体を形成して光からのダメージを軽減することが明らかになった。しかし、それ以上のエタノール濃度では、大きな凝集体を形成するか、モノマーとなって分散するために光を直接受けて、光退色を引き起こしたのではないかと考えられる。

chlorophyll, aggregation, light-discoloration

発表責任者：安田みどり（midori@nisikyu-u.ac.jp）

講演番号：2B09p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B09 会場

酵母由来の核酸成分によるアントシアニンの色調への影響と相互作用

Influence of nucleic acid components from yeast on the color tone of anthocyanin and interaction of nucleic acid and anthocyanin

○後藤 七美[1]、野口 治子[2]、佐藤 寿哉[3]、内村 信宏[3]、山下 裕隆[3]、津久井 亜紀夫[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院農化、[2]東京農大応生、[3]興人ライフサイエンス(株))
○ Nanami GOTO[1], Haruko NOGUTI[2], Toshiya SATO[3], Nobuhiro UTIMURA[3], Hirotaka YAMASITA[3], Akio TUKUI[2], Katumi TAKANO[2] ([1]Grad. Sch., Tokyo Univ. agric., [2]Tokyo Univ. agric., [3]KOHJIN Life Science Co., Ltd.)

【目的】

アントシアニン（以下、AN）とは赤色や赤紫を呈する天然の色素成分であり、果実や野菜に含まれている。AN の色調は不安定で、AN を含む加工品の赤い色は急速に失われる。この退色は、酸化であるため、酸素の除去、遮光、還元剤などにより防止できるが、食品の特性や品質を維持した状態での有効な退色抑制は見出されていない。我々は AN に酵母エキスを添加することで、AN の色調を鮮やかにし、安定性を向上させる効果があることを発見した。酵母エキスとは酵母の有用な成分を自己消化や酵素、熱水などの処理によって得られるエキスで、うま味の増強、味質の改善の他、アミノ酸やビタミン、ミネラルなどの補強目的として食品に利用されている。これまでに酵母エキス中の核酸成分が発色効果の主体であることを確認しているが、その作用機構は未だ不明である。本研究では、酵母エキスより調製した核酸を用い、核酸の色調改善効果について報告する。

【方法】

パッションフルーツ果皮より精製した AN 溶液（C3G、pH3、OD_{510}＝0.5）を試料とし、酵母エキスは興人ライフサイエンス社製を使用した。核酸は酵母エキスよりフェノール・クロロホルム法にて抽出した。AN 溶液に終濃度 0.01%、0.05%、0.1%になるように酵母エキスまたは核酸抽出物を添加し、色調を測定した。色調は吸光度（OD_{510}）、吸光スペクトル（400-600nm）および色差（CIE L*a*b*法）にて測定した。また、AN 溶液に酵母エキスまたは核酸抽出物を添加した後、NaCl および尿素を添加し、色調を測定した。

【結果】

AN は酵母エキスの添加によって 400-600nm の吸光度が上昇し、核酸抽出物の添加では 508-600nm の吸光度が上昇し、最大吸収波長は添加濃度依存的に長波長側へ移行した。核酸添加で a*値の上昇よりも b*値の低下が大きく、深色効果が顕著に確認された。NaCl 添加において、吸収スペクトルは濃度に伴い、最大吸収波長が低下し、b*値の増加がみられ、深色効果が減少した。尿素添加においても、最大吸収波長と b*値が無添加と近い値になったことから、核酸はイオン結合および水素結合で AN と相互作用していると示唆された。

anthocyanin, nucleic acid, yeast

講演番号：2B09p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B09 会場

DAS™ (Drinking Aroma Simulator) とリアルタイム質量分析計を用いたレモン飲料のフレーバーリリース分析

Flavor release of lemon beverages with DAS™ (Drinking Aroma Simulator) and PTR-TOF

○安永 元樹、葛西 賢造、服部 祥治、高垣 仁志 (曽田香料株式会社)
○Motoki YASUNAGA, Kenzo KASAI, Shoji HATTORI, Hitoshi TAKAGAKI (SODA AROMATIC Co.,Ltd.)

【目的】

香気は鼻から直接香るオルトネーザルアロマと喉から鼻に抜けるレトロネーザルアロマの２種類に区別される。いずれもフレーバー開発において重要であるが、なかでも飲料をゴクリと飲み込んだ際に呼気によって運ばれ鼻に抜けるレトロネーザルアロマは、飲料の美味しさを感じるうえで欠かすことのできない要素の１つとなっている。本研究では、飲料を飲み込んだ際の鼻に抜ける香気を再現可能なレトロネーザルアロマ再現装置「DAS™ (Drinking Aroma Simulator)」を開発し、形態の異なるレモン飲料（糖酸飲料、炭酸飲料、炭酸アルコール飲料）のフレーバーリリース特性を確認した。また、DAS™ と PTR-TOF（プロトン移動反応 TOF 質量分析計）を組み合わせて、レトロネーザルアロマの経時変化も観察した。

【方法】

実際の飲用時のように、飲料と唾液の混合液が咽頭部を通過する状態を再現した DAS™ を開発した。DAS™ を用いたレトロネーザルアロマの捕集は、口腔および咽頭部を再現した装置内へあらかじめ人工唾液を混合させたレモン飲料を流した後、装置下部から上部へ窒素ガスを流入して TenaxTA に吸着させて行った。捕集した各香気成分は加熱脱着装置を用いて GC/MS に導入した。経時変化の観察には、IONICON 社製の PTR-TOF を用い、DAS™ から得られた香気のリアルタイム分析を行った。また、レモン香気寄与成分の探索には AROMATCH® を用い、寄与が確認された香気成分について各レモン飲料中でのフレーバーリリース特性を確認した。

【結果】

今回開発した DAS™ を用いて捕集した香気と実際の呼気香気の分析結果を比較すると、香気成分バランスに加え、経時変化においても近似した結果となっており、DAS™ によってレトロネーザルアロマの再現が可能となった。各レモン飲料においてもそれぞれのフレーバーリリース特性が明確となり、様々な飲料形態にも対応可能であることが示された。さらに、AROMATCH® で選択された香気寄与成分を原料とし、DAS™ で得られたフレーバーバランスの知見を合わせることで、炭酸飲料、チューハイなど様々な飲料形態に最適化したフレーバーの開発が可能になることが示唆された。

flavor release, retronasal, lemon

発表責任者：高垣　仁志（Hitoshi_Takagaki@soda.toray.co.jp）

講演番号：2B09p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B09 会場

R-FISS®による飲料香気成分のフレーバーリリース特性評価法

Characterization of Flavor Release from Beverages during Drinking by Retronasal Flavor Impression Screening System (R-FISS®)

○糸部 尊郁、樋口 可南子、松田 知子、熊沢 賢二（小川香料株式会社）
○Takafumi ITOBE, Kanako HIGUCHI, Tomoko MATSUDA, Kenji KUMAZAWA (Ogawa & Co., Ltd.)

【目的】
フレーバーリリースは飲料の品質を左右する重要な要素の一つであり、とりわけ、口腔から鼻腔に達する香り（レトロネーザルアロマ）は重要である。飲料のレトロネーザルアロマには、飲用後速やかに強まる初発性に加え、好ましい香りの持続性も求められる。しかし、飲料に含まれる多数の香気成分について、初発性や持続性といったフレーバーリリース特性を簡便に評価することは、依然として困難である。本研究では、レトロネーザルアロマのリリース速度に着目し、Retronasal Flavor Impression Screening System（R-FISS®）による飲料香気成分のフレーバーリリース特性評価法を検討した。
【方法】
コーヒーを飲用後に鼻から排出された香気成分（1 呼吸目のみ、1～10 呼吸目の積算）を R-FISS®にて定量し、各香気成分の定量値の比（10 呼吸分の積算定量値／1 呼吸目の定量値）を算出した。次いで、ソフトイオン化質量分析計（AirSense）による鼻から排出されたコーヒー香気成分のリアルタイム測定、および Temporal Dominance of Sensations（TDS）法によるコーヒーの官能評価を実施した。
【結果】
R-FISS®にて算出したコーヒーのレトロネーザルアロマに含まれる香気成分の定量値の比は、被験者間のバラつきが小さく、各成分に特有の値を示した。この定量値の比は、10 呼吸分の積算定量値を 1 呼吸目の定量値で除した値であることから、その大小は香気成分のリリース速度を表していると予想される。すなわち、定量値の比が小さい成分（ローステイーな香りの 2-furfurylthiol など）は短時間でリリース量が減少し、定量値の比が大きい成分（ナッティーな香りのピラジン類やスモーキーな香りのフェノール類）はリリース量が一定時間維持される可能性を推察した。そこで、R-FISS®により得られた定量値の比の大小とレトロネーザルアロマの経時変化の関係を、AirSense によるリアルタイム測定にて調べた。その結果、定量値の比が小さい成分は飲用後にそのリリース量が速やかに減少し、定量値の比が大きい成分は飲用後に一定のリリース量を維持する傾向が認められた。さらに、TDS 法による官能評価では、時間の経過とともにローステイーからナッティー、スモーキーな香りへと、飲用後に感じる香りが変化した。これらの結果は、R-FISS®により得られた定量値の比を比較することで、従来、困難であった飲料に含まれる多数の香気成分のフレーバーリリース特性（初発性や持続性）を、より簡便に評価できることを示している。

Flavor Release, Retronasal Aroma, R-FISS

発表責任者：糸部 尊郁（itobe.takafumi@ogawa.net）

講演番号：2B09p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B09 会場

チョコレートにおけるキー成分の探索と評価
Determination of Key Flavor Components in Chocolate

○海江田 兼次（株式会社明治）
○Kenji KAIEDA (Meiji Co., Ltd.)

【背景・目的】チョコレートは、その芳醇な香りと奥深い味わいから多くの人に愛されてきた。近年、カカオ豆から最終商品までの工程に手間暇をかけて板チョコレートを作る、いわゆる“Bean to Bar”の流行が世界中に広がっており、日本でも様々な香味バリエーションを持つチョコレートが市場に並んでいる。チョコレートが本来持つ香味特徴、とりわけフローラル香やフルーティ香、ナッティ香は重要な香気として評価されている。チョコレートの香調は複数の香気成分の組合せによって形成されるものであり、GC/MS 分析によって数百種類の成分が検出されることは既に知られている。今回は、フローラル香、フルーティ香、ナッティ香に関与する成分について、チョコレート中での閾値を確認し、官能評価との相関性の高いキー成分を確認した。
【方法】チョコレート中に含まれる香気成分の単品を入手し、それをダークチョコレートに添加した。添加量については、各成分とも既報の水中閾値を参考にしながら、その上下数段階で 10 倍あるいは 1/10 倍オーダーとした。エイジング後、専門パネルによる官能評価を行い、パネルの半数以上が何らかのにおいを感じる、と答えた濃度を閾値とした。また、得られた各成分の閾値を元に GC/MS 分析から得られた各成分の面積値を補正することで、官能評価結果との相関解析を行った。
【結果】計 28 成分の閾値決定を行い、フローラル香およびフルーティ香についてキー成分を各 3 つに絞った。GC/MS 分析結果から、それぞれのキー成分のみ抜粋し閾値補正を行うことで、官能評価結果をより強く裏付けるものとなることが確認された。一方でナッティ香については今回検討を行った中にキー成分を見出すことが出来なかったため、改めてナッティ香の強いチョコレートを用いてにおい嗅ぎ GC を行った。その結果、ナッティ香に寄与すると考えられる成分を新たに 8 つ見つけ出した。その中にはカカオでの発見が初めてとなる 2-s-Butyl-3-methoxypyrazine や 2-Acetyl-2-thiazoline、Homofuraneol も含まれていた。

chocolate, flavor components, threshold

発表責任者：海江田兼次（kenji.kaieda@meiji.com）

講演番号：2B09p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B09 会場

キシロース存在下でタンパク質の酸加水分解により形成される新規メイラード色素について
A novel Maillard pigment formed by acid-hydrolysis of protein in the presence of xylose
○野田 響子、増崎 瑠里子、寺内 優花、村田 容常（お茶大食物）
○Kyoko NODA, Ruriko MASUZAKI, Yuka TERAUCHI, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】 本研究室において、キシロース (Xyl)-リジン系メイラード反応により生成する新規色素化合物として、ジリジルジピロロン類を単離、構造解析した (1)。このうち、ジリジルジピロロン B は、リジンの ε アミノ基がピロール環の形成に寄与していることから、食品中においても、タンパク質のリジン残基が Xyl と反応し、生成する可能性が考えられた。そこで、分離大豆タンパク質 (SPI) と Xyl を加熱した反応溶液を、2N HCl で酸加水分解し、ジリジルジピロロン B の存在を確認したところ、ジリジルジピロロン B は分解し、認められなかったが、400 nm に極大吸収を示す未知のピーク SX1 を確認した。本研究では、SX1 を単離し、構造解析を行った。
【方法】 SPI と Xyl をそれぞれ 7%、0.5%となるように蒸留水 (3 mL) に溶解し、95℃で 6 時間加熱した。この反応溶液に 12 N HCl を 3 mL 加え、110℃で 24 時間加熱し、DAD-HPLC (カラム、ODS; 溶離液、MeOH・0.1% TFA 水溶液系; 検出、220-500 nm) で分析した。精製においては、SPI と Xyl をそれぞれ 7%、2%となるように 2 N HCl (600 mL) に溶解し、30 時間還流加熱した。この反応溶液を合成吸着樹脂（ダイヤイオン HP20; 溶離液、水・MeOH 系）、ODS（溶離液、水・MeOH 系）を用いたクロマトグラフィー、分取 ODS-HPLC ならびに GPC-HPLC により単離し、SX1 の粉末を約 7mg 得、これを NMR に供した。さらに、フルフラールとシステイン (Cys) をそれぞれ 1.3%、0.1%となるように 2 N HCl (500 mL) に溶解し、2 時間還流加熱した反応溶液を合成吸着樹脂、ODS を用いたクロマトグラフィーにより単離し、SX1 の粉末約 60 mg を得、これを有機元素分析、MS、NMR に供した。また、SX1 1 mg/0.5 mL D_2O に 1 mg $NaBH_4$ を添加し、20 分放置することで、SX1 を部分的に還元し、NMR スペクトル解析を行った。【結果】 SPI-Xyl 系反応液より得た SX1 を NMR スペクトル解析したところ、SX1 はフラン環とβ位にメチレン基を持つアミノ酸の部分構造を持つ可能性が考えられた。そこで、予想されるアミノ酸と Xyl を 2 N HCl に溶解し、120℃で 1 時間加熱して DAD-HPLC 分析したところ、Cys を用いたときに SX1 の生成を確認した。さらに、Xyl を酸性条件で加熱することにより生成する主要な化合物であるフルフラールと、Cys を 2 N HCl 中で加熱することでも SX1 が多く生成することが認められたため、これを単離した。得られた SX1 を用いて呈色反応を行ったところ、SX1 は 3 級アミンであることが示された。各種機器分析により構造解析を行った結果、SX1 がエノールを有する可能性が示唆されたが、構造決定には至らなかった。そこで、SX1 を $NaBH_4$ により還元し、^{13}C-NMR スペクトル解析を行ったところ、還元前に認められた δC 182.6 ppm のピークが消失し、新たにメチレン基 (δC 29.8 ppm) と、ヒドロキシ基を持つメチン基 (δC 65.1 ppm) のピークが認められた。現在、還元 SX1 および SX1 の構造を解析中である。
(1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2065-2069 (2009)

Maillard reaction, cysteine, soy protein

講演番号：2B09p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B09 会場

メイラード反応モデル系におけるチアミン由来の黄色物質の形成
Formation of a yellowish pigment derived from thiamine in a model system of the Maillard reaction
○井越 明日香、野田 響子、村田 容常（お茶大食物）
○Asuka IGOSHI, Kyoko NODA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】チアミンは体内の解糖系において補酵素として働く水溶性ビタミンであるが、メイラード反応に関与することで肉特有の加熱香気成分を作ることも知られている。一方で、近年糖尿病合併症に対するチアミンや脂溶性の高いベンフォチアミンの大量投与が有効であることが明らかになっている。これはメイラード反応中間体であるジカルボニルの形成をチアミン類縁体が抑制するためだと言われている。このようにチアミンが食品や生体内においてメイラード反応に関与していることを示す研究は多いが、メイラード反応生成物でチアミン由来の不揮発性、特に色素成分についての研究はほとんどない。本研究ではグルコース-リシン系メイラード反応モデル系にチアミンを加え加熱すると、色素が形成されることを見出したため、形成された物質の単離・同定を行った。
【方法】グルコース (30 mM) 、リシン一塩酸塩 (30 mM) 、チアミン塩酸塩 (3 mM) を 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、100°C で 3 h 加熱し、HPLC 分析した。また、グルコース、リシン一塩酸塩、チアミン塩酸塩をそれぞれ 30 mM になるように 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、120°C で 4 h 加熱した。この反応液 5 L を 2 M NaOH で pH 8 に調整し後、合成吸着剤 DIAION HP-20 に供し、水洗後、0.1% HCl で色素 (TGL3) を溶出させた。TGL3 を含むフラクション 1 L を 2 M NaOH で pH 10 に調整後、酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を減圧濃縮した。得られた黄色のペーストをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、酢酸エチル:メタノール (32:1, v/v) で TGL3 を溶出させた。TGL3 を含むフラクションを回収し、冷暗所で一晩保存した。結晶状の沈殿が生じたため上清を取り除き、淡黄色の細かな針状結晶 (30 mg) を得た。これを元素分析、TLC, LC-MS, NMR 分析に用いた。
【結果】チアミン、グルコース＋チアミン、グルコース＋リシン＋チアミンの反応液から、390 nm 付近に極大吸収を持つ物質を検出し、標品からチアミン酸化物で黄色物質のチオクロームと同定した。また、同様にグルコース＋チアミンならびにグルコース＋リシン＋チアミンの反応液から、チアミン単体の加熱では形成されない 380 nm 付近に極大吸収を持つ物質 (TGL3) を検出した。グルコース+リシン+チアミンの反応液を合成吸着剤、溶媒抽出、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し、TGL3 の針状結晶を得た。元素分析の結果、S は検出限界値以下であり、C:58.20%、N:27.05%、H:6.14% であった。TLC の結果、ニンヒドリン試薬は陰性、ドラーゲンドルフ試薬は陽性であった。現在、LC-MS, NMR による構造解析中である。

thiamine, Maillard reaction, pyrimidine

講演番号：2B09p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B09 会場

キシロースーリジン系メイラード反応の着色におけるジカルボニル化合物や 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン（HMFO）の役割

The role of dicarbonyl compounds and 4-hydroxy-5-methyl-3(*2H*)-furanone (HMFO) on the browning of xylose-lysine Maillard reaction

○中村 美月、村田 容常（お茶大食物）
○Miki NAKAMURA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】　メイラード反応は食品の加工・調理、貯蔵中に起こる非酵素的褐変反応である。本研究室では、キシロース(Xyl)系メイラード反応において UV 280 nm に極大吸収を示す主要中間物質 HMFO を単離・同定した[1)]。HMFO は単離操作中に重合褐変が認められ、その褐変にはジカルボニル化合物の関与が示唆された。そこで、Xyl とリジン（Lys）の加熱溶液における HMFO とジカルボニル化合物の消長を調べ褐変との関係を考察した。

【方法】　13.3 mM Xyl、27.4 mM Lys 及び 27.6 mM *o*-フェニレンジアミン（OPD）を pH 8.0 のリン酸緩衝液に溶解し 100℃で 0~6 時間加熱した。また、同条件の Xyl－Lys 溶液を加熱した後、OPD を加え室温で 5 時間反応させた。次に、1.8 mM HMFO 及び 1.8 mM OPD を pH 8.0 のリン酸緩衝液に溶解し、100℃で 0~6 時間加熱した。また、HMFO 溶液を加熱後、OPD を加え室温で 5 時間反応させた。それぞれのサンプルを DAD-HPLC 及び LC-MS で分析し、HMFO とキノキサリンを定量した。さらに、13.3 mM Xyl、13.3 mM HMFO、13.3 mM メチルグリオキサール（MGO）、13.3mM ジアセチル（DA）、13.3 mM Xyl 及び 27.4 mM Lys、13.3 mM HMFO 及び 27.4 mM Lys、13.3 mM MGO 及び 27.4 mM Lys、13.3 mM DA 及び 27.4 mM Lys をそれぞれ pH 8.0 のリン酸緩衝液に溶解し 100℃で 0~6 時間加熱した後、吸光度測定、DAD-HPLC 及び蛍光 HPLC 分析を行った。

【結果】　Xyl、Lys、OPD の混合溶液を加熱し、DAD-HPLC で分析すると 280 nm に極大吸収を示す HMFO と 240 nm 及び 320 nm に極大吸収を示すキノキサリンと思われた 7 つのピークが検出された。LC-MS 分析と NMR 解析の結果、主要生成物は 1-デオキシキシロソン（1-DX）キノキサリンであった。Xyl－Lys の加熱溶液に OPD を反応させると 1-DX キノキサリンはほとんど検出されず、HMFO が検出されその後減少した。また HMFO 溶液の加熱では主に DA や MGO が検出され、その後減少した。これら結果より、Xyl－Lys 系では 1-DX を経由して HMFO が形成され、HMFO は DA や MGO に分解し、褐変していくと考えられた。Xyl、HMFO、MGO、DA やこれらの Lys 添加溶液を加熱すると Xyl と MGO では Lys により着色が促進され、HMFO は Lys により着色が抑制された。これらを GPC 分析に供すると Xyl－Lys 系と同様のピークが MGO－Lys 系で確認された。

1) Mikami et al., *Food Sci. Technol. Res.*, **23**, 283-289 (2017)

Maillard reaction, dicarbonyl compounds, browning

講演番号：2B09p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B09 会場

チーズフレーバー素材を添加した飲食品のリアルタイム香気分析によるレトロネーザルアロマ評価

Retronasal aroma evaluation of the cheese flavor produced with the fermentation method, added to food and drink by PTR-TOF

○西川 卓、安永 元樹、青山 武史、佐野 恵右（曽田香料（株））
○Suguru Nishikawa, Motoki Yasunaga, Takeshi Aoyama, Keisuke Sano (SODA AROMATIC Co.,Ltd.)

【目的】近年、乳原料は世界的に供給不安の状況下にあり、国内食品業界では加工食品中の乳原料の削減を検討し、その結果低下した乳風味を補う乳製品系フレーバーへの要望が高まりつつある。そこで昨年演者らは、比較的安定調達可能な原料で構成した液体培地に *Penicillium roqueforti* を接種して培養を検討した結果、メチルケトンを主要香気成分としたチーズフレーバー素材を開発した。本素材は、各種乳製品を気体試料に用いて当社独自のオルトネーザルアロマ評価技術である AROMATCH®を行った結果、チーズ感等の香気のエンハンス効果を確認した。[1)]

今回、本素材の用途拡大を期待して、市販飲料を気体試料とした AROMATCH®により香気のエンハンス効果を検討するとともに、本素材を添加した飲食品を喫食した後のレトロネーザルアロマの時系列挙動を直接的に計測して、実際に飲食品を喫食した時の本素材の官能特性を評価することを目的とした。

【方法】任意に選択した 22 品目の市販飲料にチーズフレーバー素材を添加して社内の専門パネリストによる官能評価を行い、香味の向上した市販飲料を選定した。続いて、選定した市販飲料を気体試料に用いて本素材の AROMATCH®を行った。また、市販飲料および乳製品に本素材を添加して喫食後、ブレスバイブレス法[2)]を参照して IONICON 社製プロトン移動反応 TOF 質量分析計（PTR-TOF）によりレトロネーザルアロマを計測した。

【結果】チーズフレーバー素材の AROMATCH®評価の結果、乳飲料やぶどう果汁入り飲料を気体試料としたときに、GC で分離されたメチルケトンとの混合気体にチョコレート感や発酵感等のエンハンス効果を確認した。続いて当該飲料類および乳製品のレトロネーザルアロマを計測した結果、メチルケトンは嚥下直後の呼気中に最大濃度となり呼吸を繰り返す度に漸減したが、成分によって漸減比率が異なったため、各成分が飲料類の余韻に影響を与えている可能性が示唆された。

1) 西川卓ほか、日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集、3C25a04
2) 下野彰夫、日本食品工学会第 17 回（2016 年度）年次大会 講演要旨集 p70

cheese flavor, methylketone, retronasal

発表責任者：佐野 恵右（keisuke_Sano@soda.toray.co.jp）

講演番号：2B09p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B09 会場

ほうじ茶中の新規重要香気成分の同定

Identification of the novel odor compound in roasted green tea

○稲永 俊介、伊藤 麻紀子、宮澤 和、吉川 啓輔、石崎 享（長谷川香料株式会社 総合研究所）
○Shunsuke INENAGA, Makiko ITO, Yamato MIYAZAWA, Keisuke YOSHIKAWA, Susumu ISHIZAKI (R & D Center, T.HASEGAWA CO.,LTD.)

【目的】
緑茶香気に関する報告は、これまでに多数なされているが、緑茶を焙煎することで得られるほうじ茶香気に関する研究は、緑茶に比較して少ない。また、明らかになっているほうじ茶香気成分[1)]を再構成しても、淹れたてのほうじ茶より立ち上る、独特な心地よく香ばしい香気の再現には到っていない。天然物の香気に関して、香気貢献度の高い微量な成分が重要な役割を果たすことは多く、これまでにも様々な果実や花などから微量な重要香気成分が見出された報告も近年続いている[2,3)]。そこで、ほうじ茶に関しても、香気貢献度の高い新規香気成分を見出すことを目的とし、詳細な香気分析を行った。
【実験及び結果】
市販のほうじ茶 100 g に対して熱湯 2000 g を加え、30 秒抽出後ろ過し、得られたほうじ茶液を減圧水蒸気蒸留に供した。得られた留出液をジエチルエーテルにより抽出し、常圧下濃縮し香気濃縮物を得た。香気濃縮物を GC-O/MS 分析に処し、AEDA 法による重要香気成分の絞込みを行った。その結果、重要香気成分として 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine、2,3-Diethyl-5-methylpyrazine、Guaiacol、Furaneol、UNKNOWN 成分の 5 成分が挙げられた。この UNKNOWN 成分を明らかにすべく、同定検討を行った。しかし、UNKNOWN 成分は含量が微量であり、ピーク強度が十分に得られなかったことから、大量入手可能なほうじ茶を処理し香気濃縮物を調製、シリカゲルカラムクロマトグラフィーや HPLC による分取を繰り返すことで、UNKNOWN 成分を純度良く得ることができた。各種スペクトル測定結果から、UNKNOWN 成分の構造が推定されたため、標品の合成を行った。合成品との各種スペクトル、諸物性の比較から、UNKNOWN 成分と合成品が非常に良い一致を示すことが分かった。
【結論】
ほうじ茶中の重要香気成分として、2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine 等の既知化合物 4 成分と、これまでに報告されていない新規化合物を見出し、これを同定するに到った。
【参考文献】
1)水上 裕造, *茶業研究報告*. **2012**, *113*, 55-62.
2)N. Miyazawa *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1990-1996.
3)A. Nakanishi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4464-4471.

roasted green tea, AEDA, novel compound

講演番号：2B09p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B09 会場

小麦ストリーム粉の揮発性成分に影響する酵素活性
Enzyme Activity affecting Volatile Components of Wheat Flour Mill Streams
○成澤 朋之[1,2]、海野 まりえ[1]、仲島 日出男[1]、小島 登貴子[1]、乙部 千雅子[3]、金子 成延[3]、杉山 健二郎[4]、朝倉 富子[2]、山田 昌治[4]([1]埼玉産技セ北部、[2]東大院農、[3](国研)農研機構・作物開発センター、[4]工学院大先進工)
○Tomoyuki Narisawa[1,2], Marie Umino[1], Hideo Nakajima[1], Tokiko Kojima[1], Chikako Otobe[3], Shigenobu Kaneko[3], Kenjiro Sugiyama[4], Tomiko Asakura[2], Masaharu Yamada[4] ([1]SAITEC-NL, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Institute of Crop Science, NARO, [4]Kogakuin Univ.)

【目的】国産麺用小麦として長年栽培されてきた農林 61 号は、後継品種さとのそらや外国産小麦 ASW にはない独特な風味があるとの評価を受けてきた。一般的に農林 61 号は製粉時の皮離れが悪く、小麦種皮近傍成分の混入が多いため、独特な風味が出るものと考えられてきた。我々は、ゆで麺の持つ揮発性成分がリポキシゲナーゼ(LOX)による不飽和脂肪酸酸化生成物によるものであることを見出し、農林 61 号においてこれらの揮発成分量が多く、LOX 活性が高いことを示した[1)]。本発表では、製粉過程において生成するストリーム粉を用いて、灰分に影響を与える小麦種皮近傍成分の混入割合と揮発性成分や酵素活性との関連性を検討した。
【実験】(国研)農研機構 次世代作物開発研究センターの実験圃場で栽培された小麦試料(農林 61 号、さとのそら、あやひかり、関東 139 号)を、同研究センターのビューラー社製テストミルにて製粉することにより、ストリーム粉試料を得た。このストリーム粉は、取り口の異なる 1-3B、1-3M および小ぶすま(Sh)を実験に用いた。これらストリーム粉の水分、タンパク質、灰分を常法により測定した。各種ストリーム粉試料および揮発性成分測定用に調製した麺生地の凍結乾燥粉末試料について、酸分解法により脂質を抽出し、BF_3 法による誘導体化を行った後に GC/MS により脂肪酸の測定を行った。また、リノール酸を基質として LOX 活性を、カテコールを基質としてポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性をそれぞれ測定した。小麦粉は 3.3 g、生地は 5 g をサンプルバイアルにとり、GC/MS を用いてこれらの揮発性成分分析を行った。
【結果】タンパク質、脂質、灰分、不飽和脂肪酸の割合、LOX 活性のいずれも、製粉工程の下流になる程高くなる傾向が確認された。PPO 活性は小ぶすまでは、灰分との相関から外れる結果となった。また、LOX 活性と灰分の相関をプロットすると、他の品種と比較して農林 61 号のみ高い値を示した。このことから、農林 61 号の高い LOX 活性は、種皮近傍成分の混入割合が高いのではなく、品種的に LOX 含有量が多い可能性が示唆された。また、GC/MS 測定の結果、多くのアルデヒド類は、製粉工程の下流になる程、検出されるコンポーネント面積値が大きくなる傾向にあった。(E)-2-Heptenal のような一部のアルデヒド類は、農林 61 号において有意に大きな値を示した。このことにより、農林 61 号にみられた独特な風味は、LOX 含有量の多さと、それに起因するアルデヒド類の生成量の多さによるものと推測された。
【参考文献】[1)] Narisawa, *et al., J Food Process Technol.* (2017) 8, 11 (in press).

Wheat Flour Mill Streams, GC/MS, Enzyme Activity

発表責任者：成澤　朋之（narisawa-t@saitama-itcn.jp）

講演番号：2B09p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B09 会場

超高速 GC とにおい嗅ぎ GCMS を用いた各種抗酸化物のリノール酸由来酸化臭抑制挙動の解析

Analysis of the antioxidant effect on the generation of oxidative odor from linoleic acid by ultra-high performance GC and GCMS-Olfactmetry

○太田 香穂、菊池 佑美佳、南 育子、小林 弘司、石川 洋哉（福岡女子大学）
○Kaho OHTA, Yumika KIKUCHI, Ikuko MINAMI, Hiroshi KOBAYASHI, Hiroya ISHIKAWA (Fukuoka Women's University)

【目的】脂質過酸化反応に起因する酸化臭の生成は、食品品質に重大な影響を与える。食品の酸化防止を目的として各種抗酸化物が使用されているが、各種抗酸化物による酸化臭の生成抑制挙動は一律でない可能性がある。そこで、本研究では超高速 GC（電子嗅覚ノーズ Heracles Ⅱ）とにおい嗅ぎ GCMS を用いて、リノール酸過酸化反応に起因する酸化臭成分に対する各種抗酸化物の生成抑制挙動を詳細に検討した。

【試料及び方法】抗酸化物として、α-tocopherol、カテキン類、フラボノール類など計 14 種の化合物を用いた。各種抗酸化物存在下で、リノール酸エマルジョンに対して AAPH を添加し、37℃・5 時間反応させた。脂質過酸化物に対する阻害効果はロダン鉄法により評価した。生成した揮発性成分は固相マイクロ抽出(SPME)法により捕集し、超高速 GC 及びにおい嗅ぎ GCMS に供した。超高速 GC では並列に配置された MXT-5・MXT-WAX カラム(10 m×0.18 mm, 膜厚 0.40 μm)で昇温分析(40℃から 250℃まで 1.5℃/s)を行った。におい嗅ぎ GC/MS では、DB-5MS カラム(30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 μm)を用い、昇温分析（40℃から 230℃まで 3℃/min）を行った。におい嗅ぎ分析では、強度を 4 段階で評価した。

【結果】高速 GC により各種抗酸化物によるリノール酸由来揮発性成分の抑制挙動を検討した。高速 GC で得られたクロマトグラムをもとに主成分分析を行った結果、抗酸化物によって揮発性成分の抑制挙動が異なることが判明した。各種抗酸化物による揮発性成分抑制挙動の違いは、リノール酸過酸化物の生成阻害率が低いほど顕著に認められた。すなわち、過酸化物の阻害率が 30%および 50%の条件下での超高速 GC データの主成分分析結果から、α-tocopherol、カテキン類（EGCg, ECg など）、ケルセチンなどがそれぞれ異なる位置に配置されることが明らかになり、揮発性成分の抑制挙動が抗酸化物によって大きく異なることが判明した。続いて、におい嗅ぎ GCMS により、リノール酸由来揮発性成分の同定と酸化臭の確認を行った結果、主要な揮発性成分として 14 成分を同定した。におい嗅ぎ分析では、その中の 9 成分が酸化臭を呈し、特に hexanal, (E)-2-heptenal, 1-octen-3-one, (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-nonadienal , (E,E)-2,4-decadienal などが強い酸化臭を呈することを確認した。これら酸化臭を呈する成分に着目して、再度超高速 GC データでの主成分分析結果を確認した結果、(E)-2-octenal, (E,E)-2,4- decadienal などの酸化臭成分に対して、ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン、ECg、EGCg などの抗酸化物がα-tocopherol よりも強い抑制効果を示すことを確認した。これら一連の結果は、脂質過酸化物に対する抗酸化効果が同等であったとしても、個々の酸化臭成分に対する生成抑制挙動が抗酸化物によって大きく異なることを示唆するものであった。

antioxidant, off-flavor, GCMS

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：2B09p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟南 B09 会場

ダージリンのマスカット香に寄与する成分の同定

Identification of an odorant contributing to muscatel flavour in Darjeeling black tea.

○福井 康大、原口 賢治、大森 雄一郎、小西 俊介、中西 啓、吉川 啓輔、石崎 享 (長谷川香料株式会社　総合研究所)
○ Yasuhiro FUKUI, Kenji HARAGUCHI, Yuichiro OHMORI, Shunsuke KONISHI, Akira NAKANISHI, Keisuke YOSHIKAWA, Susumu ISHIZAKI (R&D Center, T.HASEGAWA CO.,LTD.)

【目的】

紅茶は世界各国で消費されている飲料であり、その産地や銘柄によって風味も様々である。中でも、世界三大銘茶のひとつと評されるダージリンは、特有のマスカット香を有することで知られており、その香気特性に関して、これまでに多数の研究報告がなされている。しかしながら、そのマスカット香に寄与する成分は不明な点も多く、未だに見出されていない成分の存在が予想される。そこで、ダージリンの特徴的なマスカット香に寄与する香気成分のさらなる探索を目的とし、香気分析を行った。

【実験と結果】

ダージリン茶葉 10 g に約 500 mL の熱水を加えて調製した紅茶抽出液を冷却した後、SAFE 装置により蒸留した。得られた留出液をジエチルエーテル、塩化メチレンの順に用いて抽出し、無水硫酸ナトリウムにて脱水後、常圧下濃縮することで香気濃縮物を調製した。香気濃縮物の GC-O の結果、マスカットを想起させるフローラルな香気を有する不明成分の存在が確認された。Multi Dimensional GC-MS による分析の結果、不明成分のものと思われるマススペクトルを得ることができた。マススペクトルより、この不明成分の構造を、tetrahydro-4-methylene-2-(2-methylpropen-1-yl)-2*H*-pyran と推定した。合成した標品と比較した結果、RI、香調、マススペクトルが一致したことから、ダージリンの香気濃縮物の GC-O で検出されたマスカット様香気を有する不明成分は、tetrahydro-4-methylene-2-(2-methylpropen-1-yl)-2*H*-pyran であると同定した。

Darjeeling, muscatel flavour, tetrahydro-4-methylene-2-(2-methylpropen-1-yl)-2*H*-pyran

講演番号：2B09p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B09 会場

湘南ゴールドみかん果皮の特徴香気成分と冷凍時の変化について
Characteristic odor compounds in Shonan Gold peel and flavor changes during frozen storage
○渡辺 桃子、磯崎 理奈、尾島 光広、大槻 崇、松藤 寛（日大生資科）
○ Momoko WATANABE, Rina ISOZAKI, Mitsuhiro OJIMA, Takashi OHTSUKI, Hiroshi MATSUFUJI (Nihon Univ.)

【背景・目的】湘南ゴールドは今村温州みかんとゴールデンオレンジを交配して品種改良された神奈川県特産のみかんである。華やかで印象的な香気が特徴であるが、その香気成分についてはほとんど報告されていない。本研究では湘南ゴールドの香気成分を同定し、その特徴香を明らかにすることを目的とした。また、冷凍したサンプルは新鮮なものと比べ、華やかさが減少し青臭さが感じられたため、冷凍による特徴香の変化を検討した。
【方法】SPME（固相マイクロ抽出）と溶剤抽出の 2 つの方法にて検討を行った。SPME では、湘南ゴールド果皮を 10 倍量の蒸留水で搾汁した溶液をバイアル瓶へ入れ、60 ℃10 分間平衡化させた。その後、気相部に SPME ファイバー（PDMS/DVB, 65 μm）を入れ 10 分間静置し、揮発性成分を吸着させ、におい嗅ぎ GC-MS（Agilent 社製）にて分析した。溶剤抽出法では、果皮をジクロロメタンを用いて破砕抽出し、遠心分離後、上清を 45 ℃で加温濃縮し、におい嗅ぎ GC-MS に供した。特徴香は Aroma Extract Dilution Analysis（AEDA）法により探索した。
【結果・考察】まず、SPME を用いて果皮中の香気成分を検討したところ、82 のピークが検出され、におい嗅ぎによりにおいが感じられた 30 成分のうち、16 成分を保持指標とマススペクトルから同定した。AEDA 法により、主要香気成分は Octanal、Nonanal、Decanal、Linalool、Dodecanal の 5 種であり、直鎖のアルデヒド化合物が湘南ゴールドの華やかな香気に寄与していることが示唆された。しかし、これらの結果は全て冷凍された果皮を用いた結果であるため、冷凍による酸化等が起こっていないか、新鮮な果皮を用いて再検討を行った。結果、新鮮な果皮では Dodecanal は検出されず、他 4 種が主要香気成分であった。一方、新鮮な果皮を用いた溶剤抽出では 116 のピークが認められ、におい嗅ぎにより 48 成分が香気成分として検出された（23 成分を同定）。AEDA 法より主要香気成分は SPME と同様に 4 種であったことから、これらが湘南ゴールド果皮の主要な香気成分と判明した。また、冷凍された果皮で検出された Dodecanal は、青く刺激的な香気をもつことから、この発生が冷凍保存後の青臭い香気に影響していると考えられた。一方、冷凍前後の香気組成を比較すると、冷凍後には Limonene やγ-Terpinene が大きく減少し、ドクダミ様の Nonanal、メタル様の *p*-Cymene、薬品様のα-Terpineol が増加していた。その他にも、Carveol や Carvacrol といった化合物が検出され、冷凍後の香気変化に影響していることが示唆された。

Shonan Gold, citrus peel, GC-MS/O

講演番号：2B09p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B09 会場

亜臨界水を用いた薄荷抽出液の特性分析

Characteristics of mint extract obtained by subcritical water extraction

○野村 詩織[1]、邱 泰瑛[1]、渡邊 大吾[1]、永田 裕一[2,3]、齋藤 徹[1] ([1]北見工大、[2]北見ハッカ通商、[3]北見ハッカ研究所)
○Shiori Nomura[1], Tai-Ying Chiou[1], Daigo Watanabe[1], Yuichi Nagata[2,3], Tohru Saitoh[1] ([1]Kitami Tech., [2]Kitami Mint Tsusho, [3]Kitami Mint Lab.)

[目的]薄荷は清涼感を与えるメントールに富む植物として知られており精油の原料として利用されている。また、薄荷にはメントール以外にも香料として化粧品などに利用されるメントン、メンチルアセテートなどの有用成分が含まれている。従来、薄荷のほとんどはメントールを主成分とした精油としての利用のため水蒸気蒸留法で抽出されてきた。そこで従来の抽出法よりも効率の良い抽出方法はないかと考えた。亜臨界水は温度上昇に従って比誘電率が低下するため疎水性物質を溶解する。また、200℃前後の亜臨界水のイオン積は通常の約 1000 倍となるため酸・塩基触媒として利用できる。この 2 つの大きな特徴を有するため抽出溶媒として利用できる。本研究では従来の抽出法とは異なる亜臨界水を用いた方法で抽出を行いその特性を検討した。また、GC を用いて抽出液の主要な芳香成分量を比較した。
[方法]乾燥させた薄荷葉 5 g と蒸留水 100 mL を耐圧容器に入れた。容器を締めマントルヒーターを用いて目的の温度まで加熱した。温度は 180-260℃の 5 点とした。目的温度で 5 分間維持し亜臨界水抽出を行った。抽出後、容器を氷水で速やかに冷却した。抽出した溶液をろ過し抽出液と残渣を取得、その抽出液の特性分析を行った。分析は収率、全糖量、全フェノール性物質量、DPPH ラジカル消去能の 4 つに対し行った。次にクロロホルムと抽出液を 1:10 の割合として撹拌し微量な芳香成分の濃縮を行い GC で分析しピークを比較した。比較はメントール、メントン、メンチルアセテート、ピペリトンの 4 種に対して行った。
[結果]収率は温度 180℃から 200℃までは増加し 200℃をピークにおおよそ減少していった。全糖量は 180℃から温度上昇に従い次第に減少していった。これは亜臨界水の持つ酸・塩基触媒としての作用が関係していると考えられる。全フェノール性物質量および DPPH ラジカル消去能はどちらも 180℃から 200℃までは減少、200℃から 240℃までは増加し 240℃をピークに減少していった。また、全フェノール性物質量の推移と DPPH ラジカル消去能の推移がおおよそ一致しているためフェノール性物質の中に DPPH ラジカル消去に関係する物質が入っていると考えられる。芳香成分はメントール、メントン、メンチルアセテート、ピペリトンの 4 種すべてが温度 200℃でピークとなりそれより高温では次第に減少する結果となった。以上の結果から、亜臨界水を用いた薄荷抽出液は温度 200℃付近の抽出が最も優れているだろうとなった。また、200℃前後の抽出液は従来の水蒸気蒸留法より優れた抽出方法である可能性が推測される結果となった。

mint, subcritical water, extraction

発表責任者：邱　泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2B09p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B09 会場

シソふりかけの香気特性に関する研究

Study on aroma characteristics of dried seasoning powder of Perilla

○谷澤 純、勝野 那嘉子、西津 貴久 (岐阜大学)
○Jun TANIZAWA, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】 シソふりかけは, 調味を行って塩蔵したシソを乾燥・粉砕したもので, 特有の香気が好まれ, 古くから日本で食されている。シソの香気は製品の品質に重要であり, その香気特性は原料品種や製造工程などに依存することが経験的に知られている。しかし, シソふりかけを製品化する際に原料品種や製造工程が製品の香気特性に与える影響については不明な点が多い。そこで本研究では, 異なる品種のシソを用いて, シソふりかけの製造の初期段階で得られる塩蔵シソの香気特性と品種の関係について明らかにすることを目的とした。

【方法】 試料として国産チリメンジソ 1 種,中国産マダラジソ 3 種,中国産赤シソ 3 種を用いた。シソの葉の部分を塩蔵したものを試料とした。すなわち,原料のシソを水洗いした後,水切りを行い,塩を加えて 3 分間強く塩揉みを行った。その後再度絞り,クエン酸,塩,水を加えて 5 ℃で密封保管したものを塩蔵試料とし,香気成分分析に供した。香気成分は固相マイクロ抽出法（SPME 法）によって抽出した。SPME ファイバーは 65 μm PDMS/DVB（SUPELCO 製）を用いた。分析には GC-FID（GC-6890N,Agilent 製）を使用し,キャピラリーカラムは HP-5（Agilent 製）を用いた。香気成分の同定には GC-MS（JMS-Amsun 200/GI,日本電子製）を用いた。また,Monotrap®（ジーエルサイエンス製）で香気成分を捕集し,アセトン/ヘキサン=1/1 で溶媒抽出したものを 4^n 倍で段階希釈し,GC-O（ODO-Ⅱ, SGE Analytical sciences 製）を使用して AEDA 法を行った。

【結果】 GC-MS による塩蔵シソの香気成分分析からリモネン,ペリルアルデヒドなどの香気成分 22 成分が同定された。GC-O 分析から中国産の赤シソのうち,2 種から他の試料と質の異なる香りが感知され,GC-MS 分析により,その香気はエゴマの主要香気成分であるペリラケトンであると同定した。その試料からは,ペリラケトンの前駆体であるペリレンも同定されたため,これら 2 種はエゴマとの交雑が進んでいると推定された。AEDA 法により香気成分の FD 値を求めたところ,香気成分の中で最も FD 値が大きかったものはキノコ様の香りを持つ 1-オクテン-3-オール（FD:n=4）であった。次いで FD 値が大きかったものはシソ様の香りを持つペリルアルデヒド（FD:n=3）と青臭い香りを持つ 3-ヘキセン-1-オール（FD:n=3）であった。この結果から, 1-オクテン-3-オール, ペリルアルデヒド, 3-ヘキセン-1-オールがシソふりかけの香気特性にとって重要な化合物であることが示唆された。

Dried seasoning powder of Perilla, Aroma, Salting

講演番号：2B09p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B09 会場

Study of aroma development characteristic of Yudane bread
○Minghong YANG, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu University)

[Objectives] Yudane bread has sweet taste and special flavor. However, the special aroma profile and its development mechanism have not yet been clarified. This study investigated the fermentation aroma and baking aroma of Yudane bread, the variation of aroma contents during Yudane bread making process and the effect of Yudane method on the variation of aroma contents.

[Materials and Methods] Breads for this study were prepared using home bakery and oven. The bread making processes were the same for straight bread and Yudane bread, which were kneading, 1st fermentation, 2nd fermentation and baking. Compared to straight bread, Yudane bread had the added Yudane dough. A dough kneader was used to prepare Yudane dough, which was then stored at 4℃ overnight for next day bread-making. For crumb aroma in fermentation stage and crust aroma in baking stage, samples were collected directly from the bread making process. While for crumb aroma in baking stage, 6 g dough in a 2 mL-vial was baked using heat block at 110℃. The aroma components of bread or dough samples were absorbed by headspace SPME (85μm CAR/PDMS fiber) at 40℃ for 30 min or MonoTrap® at 55℃ for 24 h. GC-MS and GC-FID were used for qualitative and quantitative analysis respectively. GC-Olfactory was also used to identify the odor of each aroma.

[Results] Important aroma components in the crumb of Yudane bread were diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol, furfural, 2-furanmethanol and 1-butanol-3-methyl. In fermentation stage, acetyldehyde and ethanol showed higher contents in straight bread. In baking stage, contents of 2-furanmethanol, 2-acetylfuran and 2-methyl-butanal were higher in the crust of Yudane bread than straight bread. The above results implied that Yudane method influenced the aroma profile of Yudane bread.

Yudane bread, aroma, bread making process

講演番号：2B09p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B09 会場

高原山椒の香気特性に関する研究

Studies on aroma characteristics of Japanese Pepper(*Takahara sansho*)

○堀部 萌希、勝野 那嘉子、西津 貴久 (岐阜大学)
○Moegi HORIBE, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】　高原山椒は,岐阜県飛騨地方の標高約 800 m で育てられている山椒である。高原山椒は,他の栽培系統（朝倉山椒(京都や兵庫等広く栽培）,葡萄山椒(和歌山)）と香りの質が異なるとされているが,その詳細は不明である。山椒の加工品の一つである粉山椒は,種が黒くなるまで樹上で完熟させ,果皮が緑色の頃に収穫したものを原料としている。収穫した果実は,日干しや陰干しによる乾燥を行い,手もみによる軸と種の除去,石臼と杵によって粉砕をし,篩により粉山椒に加工される。この加工工程における香気成分の変化においても不明な点が多い。そこで,本研究の目的は,高原山椒の香気特性の解明,また,加工工程における香気成分の変化を明らかにすることとした。

【方法】試料には,高原山椒（2017 年収穫）を用いた。各加工工程（乾燥前,乾燥後,手もみ後,粉砕後）から試料を抜き取り,GC-FID と GC-MS による香気成分分析に供した。香気成分は固相マイクロ抽出法（SPME 法）によって抽出した。ファイバーは 65μm PDMS/DVB（SUPELCO 製）を用いた。 試料を 20 mL バイアル瓶に乾燥重量 1.0 g となるように秤量した。バイアル瓶にファイバーを設置し, 40 ℃に設定した恒温槽で 50 分間,ヘッドスペース中の香気成分を吸着させた。その後,GC-FID（Agilent 製, 6890N）と GC-MS（日本電子製, JMS-Amsun 200/GI）によって分析を行った。カラムは,Agilent 製, HP-5（膜厚 0.32 μm, 長さ 30 m）を用いた。AEDA 法を用いて粉山椒の香りに重要な香気成分を確認した。AEDA 法には,粉砕後の試料を用いた。香気成分を MonoTrap®（GL Science 製,Disk）に,55℃,1 時間吸着させ,吸着した香気成分をアセトン・ヘキサン混液（１：１,v/v）で抽出した。この溶液を溶媒で４^{n}倍に段階的に希釈を行い,GC-O（SGE Analytical sciences 製, ODO-Ⅱ）に供した。

【結果】粉山椒の GC-MS 分析によって,β-フェランドレン,ミルセン,D-リモネン,1,8-シネオール,ノナナール,シトロネラール,イソプレゴール,酢酸リナリル,酢酸テルピニル,酢酸シトロネリル,カジノール,フムレン,カジネン,ムウロレンが同定された。これらの化合物の中でシトロネラールは FD 因子が最も高く（FD:n=6）,匂いへの寄与率が高かった。シトロネラールは山椒様の香りを有していたことから,粉山椒（高原山椒）の品質に最も重要な成分であると推定した。次に各加工工程における香気成分の変化を分析した結果,乾燥と手もみ工程後に,香気成分の組成が変化することが明らかになった。

Takahara sansho, pericarp odor, powder of Japanese Pepper

講演番号：2B10a01
講演日時：3 月 16 日 09:00～ 共通講義棟南 B10 会場

鶏卵の食中毒防止を目的とした鮮度測定法の検討１（ハウユニットと卵黄係数の比較）

Study on measurement of egg freshness for prevention of food poisoning(Comparison of haugh unit and yolk index)

○久保 七彩[1]、山下 真由子[1]、中上 ひかる[2]、八田 一[1]([1]京女大院家政、[2]京女大家政)
○Nanase KUBO[1], Mayuko YAMASHITA[1], Hikaru NAKAGAMI[2], Hazime HATTA[1] ([1]Graduate School of Kyoto Women's Univ., [2]Kyoto Women's Univ.)

【目的】日本は生卵を食べる国であるため、テーブルエッグの安全性を確保する必要がある。卵の賞味期限は、現在 10 万卵に 2-3 個の割合で流通している In Egg 汚染卵対策として導入された。In Egg 汚染卵は *Salmonella Enteritidis*(SE)菌が卵黄膜上に存在し、鮮度低下に伴い卵黄膜が脆弱化すると、鉄などの卵黄内物質の卵白側へ漏出し、SE 菌が増殖してサルモネラ食中毒の原因となる。従って、卵の鮮度は卵黄膜の脆弱化を指標とする卵黄係数（YI）の測定が食中毒予防の観点からも望ましい。本研究では、卵の鮮度測定方法として、従来の濃厚卵白の高さを指標としたハウユニット（HU）と卵黄膜の脆弱化の程度を指標とした卵黄係数（YI）に着目し、それぞれのマニュアル測定値とデジタル測定値をもとに、より正確で簡易な鶏卵の鮮度測定方法を検討することを目的とした。

【方法】産卵鶏（ボリスブラウン）の卵を産卵 1 日目に購入した後、各保存条件（37℃、30℃、20℃、5℃）で賞味期限を超える期間保存し、鮮度の異なる計 402 個の卵を用いた。これらの卵をマニュアル測定では卵質計（富士平工業株式会社）とノギス、デジタル測定ではデジタルエッグテスター（DET6000：株式会社ナベル）を用い、HU・YI それぞれのマニュアル測定値・デジタル測定値を調べた。得られたデータから、マニュアルおよびデジタル測定値の相関、HU と YI の相関関係、さらに HU・YI の変動係数(CV 値)の比較を Student の T 検定によって行った。

【結果】同一の卵を測定した場合のデジタルとマニュアル測定値の相関寄与率(R^2)は、HU を用いた場合は 0.72、YI を用いた場合 0.90 であり、YI の方が強い正の相関があった。また、HU と YI の相関寄与率は 0.67 で正の相関が得られた。さらに、各鮮度指標における変動係数（CV 値：標準偏差／平均値 x100）を有意差検定したところ、YI が HU よりも優位に小さく安定していた。また、卵質計およびノギスで計測した YI を最小二乗法で比較すると R^2=0.98 と非常に高い相関が得られた。従って、ノギスを使用した場合でも、卵質計を用いた YI 測定と同等の鮮度評価が可能であった。YI を鮮度指標にする利点は、デジタルエッグテスターの導入が可能な工場での測定も、小規模養鶏場や発展途上国で安価なノギスを用いたマニュアル測定でも、変動が小さく客観的な測定値が得られることである。以上、現在、世界で鮮度指標として利用されている HU より YI はばらつきが小さく、デジタルでもまたマニュアルでも簡単に測定可能で、鮮度指標として HU より適していることが示された。

Egg freshness, Haugh Unit, York Index

講演番号：2B10a02
講演日時：3 月 16 日 09:11～ 共通講義棟南 B10 会場

鶏卵の食中毒防止を目的とした鮮度測定法の検討２ （卵黄係数とサルモネラ菌の増殖性の関係）

Study on measurement of egg freshness for prevention of food poisoning (Relation between yolk index and growth of Salmonella)

○山下 真由子[1]、久保 七彩[1]、岡 真優子[2]、上野 義栄[3]、八田 一[1]([1]京女大院家政、[2]京都府立大院、[3]京都府中小企業技術センター)

○Mayuko YAMASITA[1], Nanase KUBO[1], Mayuko OKA[2], Yoshimi UENO[3], Hajime HATTA[1] ([1]Graduated school of Kyoto Women's Univ., [2]Graduated school of Kyoto Prefectural Univ., [3]Kyoto Prefectural Technology Center for Small and Medium Enterprises)

【目的】

日本は生卵を食べる国であるため、テーブルエッグの安全性を確保する必要がある。鶏卵の賞味期限は、生食可能期限として保存温度と卵黄膜上の *Salmonella Enterica Enteritidis* (SE) 菌の増殖の関係式（ハンフリーの式）から算出される。SE 菌感染鶏は卵黄膜上に SE 菌が付着した In Egg 汚染卵を産卵し、その流通割合は 10 万個に数個と報告されている。ＳＥ菌の増殖には鉄イオンが必要であり、卵の保存中に卵黄膜が脆弱化し、卵黄内の鉄イオンが漏れると SE 菌の増殖が始まると言われている。本研究では卵黄膜強度と鶏卵の鮮度測定値である卵黄係数(YI、卵黄の高さ割る直径)の相関関係を調べ、YI から卵黄膜の強度が推定できるか検討した。また、卵の保存日数とともに卵黄から浸出する IgY や鉄イオンの量を測定し、SE 菌の増殖性との関係からハンフリーの式の妥当性を確認した。

【方法】

新鮮な鶏卵を温度 37℃で 8 日間、温度 30℃湿度 75％で 12 日間、温度 20℃湿度 65％で 25 日間、温度 5℃で 4 カ月間保存し、経時的にその鮮度評価を行った。YI はデジタルエッグテスター（DET6000：株式会社ナベル）を用いて測定した。卵黄膜強度はテキソグラフ（株式会社日本食品開発研究所）により卵黄膜の破断変形荷重(gf/cm2)として測定した。その際、卵黄を 20ml ビーカーに入れ、底面積が 2.0cm2 のプランジャーを用いた。鶏卵の鮮度と卵黄表面漏出物の量的変化は、温度 30℃、湿度 75％で 0・6・9・12 日間保存した卵の卵黄を分離し、その表面を生理食塩水で洗浄し、濃縮後、ICP 発光分光分析装置を用いて Fe の量を、ELISA 法で IgY 抗体量を測定した。続いて、温度 30℃、湿度 75％で 0・6・9・12 日間保存した卵の卵黄を分離し、SE 菌液に 20 時間浸漬培養後、それぞれの菌数を ATP の発光測定法（BackTiter-Glo：プロメガ株式会社）を用いて測定した。

【結果・考察】

鮮度の異なる鶏卵 299 個を用いて測定した卵黄係数(YI)は、それぞれの卵黄膜強度(gf/cm2)と正の相関が得られ、その相関寄与率 R２は 0.86 であった。鶏卵鮮度が低下すると、卵黄表面上に漏出した Fe 量と IgY 抗体量が増加した。また、卵黄を漬けた SE 菌液は、鮮度がより低下した卵の卵黄ほどより SE 菌の増殖量が多くなった。さらに賞味期限を超えた卵の卵黄では SE 菌の増殖量が特に多くなった。従って、鮮度の低下に伴い卵黄膜が脆弱化して透過性が向上し、卵黄内物質が漏出することで SE 菌が増殖しやすくなると言える。本研究により鶏卵賞味期限の設定根拠が実証できたと考える。

Egg freshness, York Index, Salmonella

講演番号：2B10a03
講演日時：3 月 16 日 09:22～ 共通講義棟南 B10 会場

食品中から分離された低温生育性セレウスグループの解析

Analysis of psychrophilic *B.cereus* group isolated from cooked chilled foods

○外川 理絵[1]、田島 洋介[1,2]、大谷 重徳[1,3]、小泉 大輔[1]、岩崎 卓己[4]、川崎 浩子[4]、庵原 啓司[1]([1]マルハニチロ（株)、[2]日本適合性認定協会、[3]ニチロ畜産（株)、[4]製品評価技術基盤機構)
○ Rie TOGAWA[1], Yosuke TAJIMA[1,2], Shigenori OTANI[1,3], Daisuke KOIZUMI[1], Takumi IWASAKI[4], Hiroko KAWASAKI[4], Keishi IOHARA[1] ([1]Maruha Nichiro Co., [2]JAB, [3]NICHIRO CHIKUSAN CO., LTD., [4]NBRC)

【背景】ロングライフチルド食品は、食品の廃棄ロス削減や、消費者の生活スタイルへの順応性や嗜好性、および小売店が抱える問題点の解決に貢献するという点で注目を集めており、近年市場規模が拡大傾向にあるカテゴリーの一つである。一方で、ロングライフチルド食品はレトルト食品等と比べ、加熱によるダメージを抑えた高品位な食品であるため、低温生育性の耐熱性芽胞菌のリスクがある。特に、病原微生物の一種である *Bacillus cereus* 種は低温生育能が報告されており、ロングライフチルド食品において特に重要なターゲット菌と考えられる。今回、演者らは当該食品を分離源とする低温生育性 *B. cereus* 種およびその近縁種に着目し、その性状解析および菌種の同定を行った。
【方法・結果】チキントマト煮込み試作品の 10℃における保存試験にて、セレウス選択培地（NGKG 培地）で生育した 1 株（No.1165 株）を分離した。本菌は 10℃でも生育性を示し、ロングライフチルド食品において増殖リスクがある菌であった。本菌の MALDI-TOF MS による解析結果では、*B. cereus* 種と判定されたが、MALDI-TOF MS を用いた同定では *B. cereus* 種およびその近縁種の識別は困難であり、*B. cereus* 種とは断定できなかった。一方、16S rRNA 遺伝子配列の相同値では、*B. thuringiensis* ATCC 10792^T との一致率が 100%、*B. cereus* NBRC15305^T との一致率が 99.72%であったため、*B. cereus* よりも *B. thuringiensis* である可能性が示唆された。また、全ゲノムの ANI (Average nucleotide identity)解析の結果からも、*B. thuringiensis* ATCC 10792^T との一致率が 97.85%、*B. cereus* NBRC15305^T との一致率が 96.52%であり、*B. thuringiensis* と高い相同性を示したことから、*B. cereus* とは別種であり、*B. thuringiensis* と同定した。ロングライフチルド食品の微生物管理を行う上で、*B. cereus* 種は重要な菌であり、迅速に同定してその対応を図る必要があるが、セレウス選択培地や MALDI-TOF MS（フィンガープリント解析）等では種を判別できない。そのため、種を迅速かつ高精度の識別・同定する方法の確立が望まれる。

Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, identification

発表責任者：庵原啓司（k-iohara@maruha-nichiro.co.jp）

講演番号：2B10a04
講演日時：3 月 16 日 09:33～ 共通講義棟南 B10 会場

食中毒原因菌であるセレウス菌（*Bacillus cereus*）の迅速かつ精密な識別法の開発
Development of rapid and precise identification method for food poisoning bacterium *Bacillus cereus*

○川崎 浩子[1]、下平 潤[1]、上條 知昭[1]、田島 洋介[2,3]、大谷 重徳[2,4]、庵原 啓司[2]([1]製品評価技術基盤機構、[2]マルハニチロ（株)、[3]日本適合性認定協会、[4]ニチロ畜産（株））
○Hiroko KAWASAKI[1], Jun SHIMODAIRA[1], Tomoaki KAMIJO[1], Yosuke TAJIMA[2,3], Shigenori OTANI[2,4], Keishi IOHARA[2] ([1]NBRC, [2]Maruha Nichiro Co., [3]JBA, [4]NICHIRO CHIKUSAN CO.,LTD.)

【背景】食品、医薬品及び環境などの微生物管理において、衛生管理、汚染原因の究明、二次汚染防止及び殺菌処理方法の対応策は重要である。特に、食品の製造や臨床医療分野においては、汚染原因微生物や病原細菌を迅速に同定してその対応を図る必要がある。病原微生物の一種である嘔吐毒を産生するセレウス菌（*Bacillus cereus* 種）とその近縁種は類似性が高く、従来の微生物同定法や、近年注目を浴びているマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）を用いた微生物由来全タンパクのフィンガープリント法でも、それら微生物の識別・同定は困難であった。そこで、*B. cereus* 種とその近縁種に特異的なタンパク質をバイオマーカーとし、操作が簡便な MALDI-TOF MS を用いてバイオマーカーを検出することにより、迅速かつ精度良く *B. cereus* 種を識別・同定する方法を開発した。
【方法及び結果】*B. cereus* 種とその近縁種の全ゲノム塩基配列を取得し、供試株の再同定を行うとともに、*B. cereus* 種とその近縁種の計 11 種の全ゲノム情報による再分類を行った。確定した分類体系を基本にし、11 種に特異的なリボソームタンパクを選抜し、それらをバイオマーカー候補とした。次に、実際に *B. cereus* 類縁菌 31 株に対し、Bruker 社と島津製作所社製の 2 種の MALDI-TOF MS を用いて、微生物由来のタンパク質を分析し、先のバイオマーカー候補の内、安定的に検出できる 7 つのタンパク質（リボソームタンパク質 L33, L30, L29, S18, L31, S20, L22）を見出し、最終的にバイオマーカーとして選抜した。本方法は、コロニーから少量の微生物細胞を採取し、ギ酸処理を行い、マトリクス剤と混合して、MALDI-TOF MS に供するだけで、微生物由来のタンパク質が検出される。その中から 7 つのバイオマーカーの m/z 値を取得し、比較することにより、*B. cereus* 種とその近縁種の計 11 種を識別することができる。コロニーから検出結果を得るまでにかかる時間は数分である。本方法は、チルド食品をはじめとする様々な食品製造ラインにおいて、食品の品質管理や工程の微生物安全管理に利用可能であり、食の安全に貢献できる手法である。

MALDI-TOF MS, Bacillus cereus, identification

発表責任者：川崎浩子（kawasaki-hiroko@nite.go.jp）

講演番号：2B10a05
講演日時：3 月 16 日 09:44～ 共通講義棟南 B10 会場

ラオス淡水魚発酵調味料におけるヒスタミン発生の特性および産生菌の分離
Properties of histamine content and histamine-producing bacteria in fermented freshwater fish paste products in Laos

○丸井 淳一朗[1]、羽佐田 勝美[1]、イエタオ ギアバン[2]、スパチャイ プパスック[2]、サイビセン ブロム[2] ([1]国際農研、[2]ラオス大農)
○ Junichiro MARUI[1], Katsumi HASADA[1], Yethao GIAVANG[2], Suphachai PHOUPASOUK[2], Sayvisene BOULOM[2] ([1]JIRCAS, [2]Univ. of Laos)

【目的】東南アジア唯一の内陸国であるラオスでは、多様な淡水魚が重要な食料とされ、その風味や保存性を高める発酵技術が伝統的に発達している。ラオスの伝統的な水産発酵食品の中でも、淡水魚発酵調味料〔ラオス名：*pa-daek*（パデーク）〕は、淡水魚を塩、米ぬかと混ぜ合わせてペースト状に発酵させ、常温での長期保存を可能にしている。塩味と、後を引くうま味が特徴的で、万能調味料として様々な料理に用いられる。同様の発酵調味料は、ラオスに隣接するタイやカンボジアなどインドシナ半島の国々でも古くから普及している。ラオスのパデークは、農村世帯で自家製され、地域の食料資源を活かした持続的な栄養供給に長く寄与してきた。また、最近の経済発展や食環境の近代化に伴い、市場等で販売される商業生産品の普及も著しい。更に、国内最大の消費地である首都ビエンチャンでは、近郊に位置する巨大ダム湖の豊富な水産資源を活用したパデーク生産が国の定める一村一品制度に認定され、生産・販売の促進が図られるなど、地域食料資源を活用したフードバリューチェーンを形成する高付加価値産業としての期待も高まっている。我々は、この様なラオスの発酵食品において長く受け継がれてきた伝統知識に加え、科学的知見を活用した合理的な生産管理技術による品質安定・向上を目指した共同研究を推進している。本発表では、パデークの変敗要因と考えられるヒスタミンに着目し、農村世帯で自家用または商業目的で生産された製品のヒスタミン量と製法との関連を検証するとともに、産生菌の分離を実施したので報告する。
【方法及び結果】ラオス中部農山村で実施した聞き取り調査では、保存食・万能調味料として多くの世帯で日常的にパデークが用いられる現状に加え、ヒスタミンによると思われるアレルギー様の食あたりを懸念する声も聞かれた。そこで本研究では、農村世帯で自家用または商業用とされるパデークの製法に関する情報を収集するとともに、製品中のヒスタミン含量および、パデーク発酵の指標となる塩分、pH、および乳酸含量を測定した。その結果、古くから受け継がれた製法に沿って商業用にパデークを生産するビエンチャン近郊の世帯のものに比べ、今回の調査を実施した農山村地域で自家用として作られたものでは、製品ごとの塩分濃度のばらつきが顕著であり、ヒスタミン含量が高い傾向も見られた。現在、これらの試料を用いたヒスタミン産生菌の分離を行い、菌種の同定とともに、生育に及ぼす塩分、pH の影響など、ヒスタミン産生を抑制する発酵管理に向けた増殖特性の分析を行っている。

fermented fish, histamine, Laos

発表責任者：丸井淳一朗（jmarui@affrc.go.jp）

講演番号：2B10a06
講演日時：3 月 16 日 10:05～ 共通講義棟南 B10 会場

カリン（*Pseudocydonia sinensis*）の抗ノロウイルス効果

Anti-noroviral effect of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis*)

○詹 佳樺[1]、神本 真紀[1,2]、藤阪 幸恵[1]、岩野 弘嗣[1]、島本 敏[1]、成谷 宏文[1]、島本 整[1]([1]広島大・院・生物圏科学・食品衛生、[2]（独）酒類総研)
○Chiahua Chan[1], Maki Kamimoto[1,2], Yukie Fujisaka[1], Hirotsugu Iwano[1], Toshi Shimamoto[1], Hirofumi Nariya[1], Tadashi Shimamoto[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2]Nat. Res. Inst. Brewing)

【目的】

ノロウイルスは日本のみならず，世界中で感染性胃腸炎や食中毒を引き起こす主要なウイルスである。世界保健機関（WHO）の食中毒に関する資料によると，2007 年から 2015 年までノロウイルスは世界第一位の下痢性食中毒の原因となっており，大きな問題である。また，日本国内でもノロウイルスは 2001 年以降，常に食中毒患者数で原因病原体第一位を占めている。したがって，食品衛生分野におけるノロウイルス対策は極めて重要であり，急務となっている。一方，日本の厚生労働省により推奨されるノロウイルスの不活性化方法は，加熱処理（85℃，１分以上）または次亜塩素酸ナトリウムによる消毒である。しかし，加熱処理はすべての対象物に適用できず，また有害な次亜塩素酸ナトリウムも使用が限定される。そのため，人体あるいは調理現場で用いることが可能な安全・安心なノロウイルス対策消毒剤開発が望まれている。我々の先行研究で，渋柿抽出物に含まれる柿タンニンに強い抗ノロウイルス効果があることを発見し，すでに商品化を行っている。本研究では新たな抗ノロウイルス素材であるカリンを材料として消毒剤を開発するために，抗ウイルス活性の評価を行った。

【方法】

カリンの果実を凍結乾燥して，粉末化した後，10% から 100% エタノールを用いて 5% 抽出液を調製した。また，ノロウイルスは in vitro での培養法が利用できないため，ノロウイルスの代替ウイルスである MS2 ファージを用いて，プラークアッセイによる感染価測定を行った。また，患者の糞便由来のヒトノロウイルス（GII.4）を使用して，qRT-PCR 法によるウイルスゲノム測定を基準としてカリン抽出液の抗ノロウイルス効果の検証を行った。

【結果】

カリン抽出液の MS2 ファージに対する効果では，5% 抽出液の場合，20% エタノールを溶媒とした抽出液が最も抗ウイルス効果が強く，約 4 Log PFU/ml の減少効果があった。一方，0.5% 抽出液の場合，50% エタノール抽出液が最も強い抗ウイルス効果を示した。抗ノロウイルス効果については,50% エタノール抽出液は 95%以上ノロウイルスゲノムを減少させる効果を示した。本研究成果を基礎として，新規消毒剤の開発を目指す。

【文献】

1)Kamimoto et al., J Food Sci. 79(5): M941-M946 (2014)

Norovirus, Chinese quince, Disinfectant

発表責任者：島本整（tadashis@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B10a07
講演日時：3 月 16 日 10:16～ 共通講義棟南 B10 会場

低 pH におけるコーヒーの殺菌作用について

Bactericidal effect of coffee under low pH condition

○上野 寛子、筒浦 さとみ、村田 容常（お茶大食物）
○Hiroko UENO, Satomi TSUTSUURA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】

有機酸の抗菌作用は pH によって変わり、酸性 pH の方が効果が大きくなることが知られている。一方、人の胃の中は pH 1.5~3 と食品よりかなり低い pH に保たれており、有機酸の抗菌作用がより大きくなることが期待される。しかし、微生物の生育や死滅に対する有機酸の影響は、胃のような低 pH ではほとんど調べられていない。そこで本研究では、有機酸を含む飲料であるコーヒーについて、低 pH での殺菌作用を調べた。また、コーヒーの低 pH での殺菌作用が有機酸によるものかを調べるため、コーヒーを分画し、各画分の殺菌活性を評価した。

【方法】

供試菌株として *Escherichia coli* 3 株、*Salmonella* 2 株を用いた。試料として、ソリュブルコーヒー（0~1 %）、クロロゲン酸（0~0.5 %）、ソリュブルコーヒー溶媒抽出物（各ソリュブルコーヒー1 %相当）を用いた。ソリュブルコーヒー溶媒抽出物は、ソリュブルコーヒーをヘキサン、ジエチルエーテル、エタノール、メタノール、熱水で順に抽出し、それぞれの画分に溶出したものとした。また、熱水画分はさらに酸沈殿画分とその残渣（水溶性画分）に分けた。各菌株は前培養した後それぞれ 3 株または 2 株を混合し、試料を添加して pH を調整した HI 培地に初発菌数が 10^6 CFU/mL となるように植菌した。試料の殺菌作用を調べるため、植菌後 0~3 時間の生菌数をコロニー計数法にて測定した。また、菌の生育状態による耐酸性の違いを調べるため、前培養の時間を変えて評価を行った。

【結果】

ソリュブルコーヒーは、*E. coli* に対しては pH 1.5、*Salmonella* に対しては pH 3 で殺菌作用を示し、ソリュブルコーヒーを 1 %添加した時、それぞれ 2 時間、1.5 時間で菌が検出されなくなった。また、前培養の時間を変えたところ、いずれの菌も前培養の時間が短いほど早く死滅し、対数増殖期の菌よりも定常期の菌の方が耐酸性が高いことが示された。クロロゲン酸も *E. coli* に対しては pH 1.5、*Salmonella* に対しては pH 3 で殺菌作用を示し、クロロゲン酸を 0.5 %添加した時、それぞれ 3 時間、2 時間で菌が検出されなくなった。しかし、0.1 %添加では殺菌作用を示さず、ソリュブルコーヒー中のクロロゲン酸含有量を考慮すると、その作用は弱いものであった。ソリュブルコーヒー溶媒抽出物の殺菌作用を調べたところ、水溶性画分が活性の主要な部分であったが、活性はソリュブルコーヒーと比べると弱かった。メラノイジンと思われる酸沈殿画分は強い活性を示さなかった。

coffee, bactericidal, low pH

講演番号：2B10a08
講演日時：3 月 16 日 10:27～ 共通講義棟南 B10 会場

大気圧プラズマによるバジルの殺菌と香気成分評価

Sterilization of Basil by APPJ and Analysis of odor Components

○森田 祐介[1]、武村 祐一朗[1]、古田 雅一[2]、藤山 貴友[2]([1]近大院総理工、[2]大阪府大工)
○Yusuke MORITA[1], Yuichirou Takemura[1], Masakazu Furuta[2], Takatomo Fujiyama[2] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【背景目的】

香辛料にはその製造過程で土壌由来の菌が多数付着している。そのため、食品に添加する場合には食品衛生法に則った菌数にまで殺菌処理を行う必要がある。従来微生物の滅菌法には高温処理を用いる加熱滅菌、殺菌作用の強いガスを用いるガス滅菌、適当な濾過装置を用いる濾過滅菌、紫外線、放射線滅菌などがある。我が国では現在、香辛料などの粉末状の食品に対して過熱水蒸気を用いた気流式過熱水蒸気滅菌が採用されている。本法は無酸素状態での処理が可能であり、加熱時間が短いため他の加熱殺菌に比べて成分の劣化が少ないことが特徴であるが、香辛料においては高温処理のために本来もつ風味の損失や色合いの劣化が問題とされている。そこで近年注目されているのが、従来の加熱殺菌に対し比較的低温で殺菌処理が可能なプラズマを用いた殺菌処理法である。本研究では大気圧プラズマジェットによる殺菌効果の検証と品質維持を目的として、各種ガスプラズマによるバジルに付着した微生物への作用に着目し、処理後の菌数と菌の状態および香気成分の変化について解析した。

【方法および結果】

ガラス筒に未殺菌のバジル 1.0 g を入れ、フィルターからガスが抜けるように設置し、ガス流量 20 L/min、印可電圧 20 kV、ノズルからフィルターまでの距離 15 mm、照射時間 0～10 分 を実験条件とした。またプラズマ照射の際には、熱電対を用いてガラス筒表面の温度が上昇しないよう調整しつつ実験を行った。その結果、プラズマ照射による優位な殺菌性が示された。同照射後の試料のうち 0.5 g を回収液 50 ml に入れ、希釈したものを標準寒天培地に塗布して生存菌数を求めた。その結果、プラズマ照射による優位な殺菌性が示された。同時に残りの試料のうち 0.3 g を熱測定装置に入れ、生存菌の増殖回復に伴う微小な熱発生を定量し、処理後の微生物の回復挙動について評価した。

また、N_2ガス 2 L を入れたサンプリングバッグに 5 分間プラズマを照射したバジル 3 g を入れ、そのうち 0.5 L を臭い嗅ぎガスクロマトグラフ質量分析計（Sniffer-9000, アルファモスジャパン、QP2010 Ultra, 株式会社島津製作所)、1.5 L を複合型ガスセンサー(FF-2020, 株式会社島津製作所)に用いて処理後の香気成分変化の分析を行った。その結果、プラズマ処理による香気成分の変化の少ないことが確認できた。

Microorganism, Sterilization, Plasma

発表責任者：武村　祐一朗（takemura@ele.kindai.ac.jp）

講演番号：2B10a09
講演日時：3 月 16 日 10:38～ 共通講義棟南 B10 会場

可溶性の食品添加物粒子による腸内細菌叢の構造変化

Structural changes of intestinal bacterial flora induced by soluble food additive particles

新居 靖崇、下田 舞、○徳本 勇人（阪府大）
Yasutaka Nii, Mai Shimoda, ○Hayato Tokumoto (Osaka Prefecture Univ.)

【背景・目的】ナノ粒子製造技術の発展に伴い、食品の食感や色合いを改善させる食品添加物粒子の微小化技術も向上している。本研究では赤色着色料に用いられている、可溶性の Fe_2O_3 粒子に着目した。ここで、同一体積中に存在する粒子は粒径が小さくなると、その個数濃度が増加して反応界面積が増大することで劇的に反応性が向上する。そのため、粒径の小さい Fe_2O_3 粒子を摂取すると、強酸性である胃酸によって、Fe_2O_3 粒子から溶解する鉄イオン量が飛躍的に増加する可能性がある。鉄は微生物の生育に必要不可欠な微量元素であるが、通常、腸内鉄イオン濃度は非常に低い。そこへ、大量の鉄イオンが腸内に流入すると、鉄要求性の高い菌が鉄イオンを吸収して増殖し、その結果、腸内細菌叢の構成菌種の優劣が大きく変化する可能性がある。そこで、本研究では Fe_2O_3 粒子をマウスに経口投与した後、排出された糞便を腸内細菌叢として採取し、糞便の構成菌種を 16S rRNA 遺伝子を指標として解析し、腸内細菌叢を構成する優勢種が変化するのかどうかについて、検討を行った。
【方法】胃酸は pH が 1～3、主成分は塩酸であることから、本研究では、0.1 M 塩酸水溶液を胃酸と仮定して実験に用いた。0.1 M 塩酸水溶液に粒径の異なる Fe_2O_3 粒子を任意の分散濃度で添加し、Fe_2O_3 粒子から溶解した鉄イオン濃度を原子吸光高度計で測定した。次に、Fe_2O_3 粒子を飼料に混練し、マウスに 3 週間経口投与し、排出された糞便を腸内細菌叢として採取した。その後、採取した糞便から腸内細菌叢の DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の可変領域である V3-V4 領域を PCR で増幅させた。続いて、次世代シークエンサーを用いて、腸内細菌叢の構成菌種を同定し、その存在割合を算出した。
【結果・考察】Fe_2O_3 粒子は粒径が小さくなるに従って、0.1 M 塩酸水溶液への溶解性が飛躍的に向上することが分かった。そのため、粒径が小さい Fe_2O_3 粒子を過剰に摂取すると、胃酸によって Fe_2O_3 粒子から鉄イオンが大量に溶解し、腸内に流入する可能性が示唆された。次に、粒径が小さい Fe_2O_3 粒子をマウスに過剰に投与すると、マウスが下痢を発症した。16s rRNA 解析の結果、腸内細菌叢の多様性は低下し、病原菌を多く含む微生物群である *Clostridiaceae* が腸内で 37%まで優勢化していた。しかし、経口投与を停止すると乳酸菌である *Lactobacillaceae* が 34%まで優勢化し、*Clostridiaceae* の増殖が抑制される可能性が示唆された。これらの結果から、Fe_2O_3 粒子から溶解したイオンが腸内に流入し、腸内の鉄イオン濃度が上昇すると、腸内細菌叢を構成する優勢種が変化し、菌叢の変化が宿主の健康状態に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。また、要因である Fe_2O_3 粒子の投与をやめると、変化した菌叢を修復するように、優勢種が再度変化し、菌叢が元に戻ることも明らかとなった。

Fe_2O_3 particle, food-additive particles, intestinal bacterial flora

講演番号：2B10a10
講演日時：3 月 16 日 10:49～ 共通講義棟南 B10 会場

細胞固定化センサチップを用いた Surface Plasmon Resonance (SPR) センサによる細胞毒性評価法の開発

Evaluation of cytotoxicity by Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor using cell-immobilized sensor chip

○小林 弘司、中原 萌、緒方 千晶、山内 良子、石川 洋哉（福岡女子大・国際文理）
○ Hiroshi KOBAYASHI, Moe NAKAHARA, Chiaki OGATA, Ryoko YAMAUCHI, Hiroya ISHIKAWA (Fukuoka Women's Univ.)

【目的】従来の培養細胞を用いた毒性評価は，細胞の形態変化や死滅を観察する必要があり，結果が得られるまでに数日を要する．例えば，ベロ毒素を検出するためのベロ細胞壊死性試験では，細胞に試料を添加したのち 48 時間後の観察が必要である．また，コロニー形成試験では細胞に試料を添加した後，V79 細胞を用いた試験で 6～7 日，L929 細胞を用いた試験で 7～9 日培養後にコロニー数を数える．このため，簡易迅速な毒性評価法の開発が求められている．Surface Plasmon Resonance (SPR) センサは物質間の相互作用をリアルタイムに測定することが可能であり，SPR センサにより抗原抗体反応を測定することで標的物質を検出する手法が多く報告されている．一般的に SPR センサでは，センサチップに蒸着してある金膜表面から 500 nm 以内の範囲の密度変化しか測定できないとされているが，近年，培養細胞をセンサチップ上に固定化し，細胞内の応答反応を検出する例も報告されており，細胞内の状態変化の測定にも利用可能だと考えられる．そこで本研究では，SPR センサを用いて細胞応答の検出を試みた．細胞応答のモデルとしては，ベロ毒素に対するベロ細胞の応答反応を選択した．
【方法】まず，センサチップ上への細胞固定化および SPR 測定条件の最適化を行った．センサチップ上にベロ細胞（JCRB0111）が 6.2 x10^4 cells/mL となるように播種し，センサチップ上でセミコンフルエントになるまで 10%FBS 添加 DMEM または KBM（無血清）培地で培養し，培養前後の SPR シグナルを測定することにより細胞の固定化を確認した．また，同時に SPR 測定時に最適なバッファーの検索も行った．最後に，センサチップ上に固定化したベロ細胞の添加したベロ毒素に対する応答が SPR シグナル変化により測定できるか検討を行った．SPR センサは、パーソナル SPR センサ RANA（九州計測器株式会社）のプロトタイプを使用した．
【結果･考察】　KBM 培地よりも 10%FBS 添加 DMEM 培地を用いて培養した方がセンサチップ上に固定化されたベロ細胞数は多かった．10%FBS 添加 DMEM 培地を用いる場合は，血清成分の金膜への付着によるノイズシグナルが懸念されたが，血清成分によるシグナルは確認されなかった．また，SPR 測定時には培地を取り除き，PBS に置換することで SPR シグナルは安定した．さらに，ベロ細胞がセミコンフルエントに達したセンサチップにベロ毒素添加し，経時的に SPR シグナルを測定した結果，添加後 1 時間に無添加のセンサチップと比較して有為な SPR シグナル上昇を確認した．また，SPR シグナル上昇は添加したベロ毒素濃度依存的であった．同濃度の毒素を 6-well plate に播種したベロ細胞に添加し，経時的に細胞の形態を観察した場合，添加 6 時間後でも毒素添加区と毒素無添加区の細胞の状態に違いは確認できなかった．以上の結果より，細胞固定化センサチップを用いた SPR センサにより，試験物質と細胞との応答を迅速に測定できることが示された．今後は，ベロ毒素以外の物質との反応が測定できるか検討していく予定である．

SPR sensor, cytotoxicity, cell response

発表責任者：小林　弘司（kobayashih@fwu.ac.jp）

講演番号：2B10a11
講演日時：3 月 16 日 11:10～ 共通講義棟南 B10 会場

玄米の励起蛍光マトリクスと脂質劣化との関係

Relationship between excitation-emission matrix and lipid decomposition of brown rice

○石垣 貴大[1]、田原 裕介[2]、高津 地志[3]、藤田 明子[3]、渡邉 義之[2]、野村 正人[2] ([1]近畿大院システム工、[2]近畿大工、[3]（株）サタケ)

○Takahiro ISHIGAKI[1], Yusuke TAHARA[2], Kunimoto TAKATSU[3], Akiko FUJITA[3], Yoshiyuki WATANABE[2], Masato NOMURA[2] ([1]Grad. Sch. System. Eng. Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Taste Research Lab. Engi. Div. Satake Co.)

【緒言】

現在，米の鮮度の評価は，試薬を使用して米を染色し目視や比色分析にて行われている．しかし，目視による大きな誤差が生じたり，試薬による前処理が必要となるため，手法の改善や新規な方法が求められている．一方，蛍光分光光度計による測定は試薬を必要とせず，簡便に試料の成分変化を捉えることが可能である．そこで本研究では，蛍光分光光度計を用いて非破壊的に米の鮮度や品質の評価を行うことを目的とし，米の鮮度・品質の指標となる脂肪酸度および過酸化物価と励起蛍光マトリクスとの相関関係を解析した．収穫年度の異なる複数の品種の玄米について測定および解析した結果を報告する．

【実験方法】

平成 19～28 年度に収穫された魚沼産コシヒカリ，広島産ヒノヒカリ，秋田産あきたこまち，北海道産きらら 397 の玄米を試料として使用し，脂肪酸度および過酸化物価を測定した．それぞれ約 30 g を秤量し，ミルサーで 1 分間粉砕した．粉砕した試料を共栓付き三角フラスコに約 10.00 g 秤量した．その後，ヘキサンを 50 mL 加え，インキュベーター内で振盪（200 rpm/min，15 分間，30 ℃）して油脂を抽出した．抽出後，水酸化カリウムを用いた脂肪酸度測定および比色法を用いた過酸化物価測定を行い，玄米の理化学特性値を得た．

上記の玄米を同様に粉砕し，蛍光用石英セルに充填，蛍光分光光度計（F-7100，日立ハイテクサイエンス）を用いて励起蛍光マトリクスを測定した．

【結果および考察】

いずれの玄米においても脂肪酸度は一時的に上昇したが，その後減少する傾向が観察された．脂肪酸度の増大は，玄米中のアシルグリセロールに生じた加水分解反応が原因として考えられる．脂肪酸度の減少については，不飽和脂肪酸の過酸化および低分子化反応に起因した低級脂肪酸などの生成と揮発によるものと推察された．

理化学特性値と蛍光特性との間には比較的有意な相関が示された．しかし，その相関性には品種間差が存在することが示された．

Brown rice, Excitation-emission matrix, Lipid decomposition

発表責任者：渡邉義之（wysyk@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：2B10a12
講演日時：3 月 16 日 11:21～ 共通講義棟南 B10 会場

脂質ハイドロゾルの安定性に及ぼす流動特性の影響
Effect of rheological property on stability of lipid hydrosol
○品田 将史[1]、國分 慶有[2]、渡邉 義之[2]、澤邊 昭義[3]、菅野 憲一[4]、野村 正人[2] ([1]近畿大院システム工、[2]近畿大工、[3]近畿大農、[4]近畿大産業理工)
○ Masafumi SHINADA[1], Keiyu KOKUBU[2], Yoshiyuki WATANABE[2], Akiyoshi SAWABE[3], Kenichi KANNO[4], Masato NOMURA[2] ([1]Major in Systems Engineering, Graduate School of Systems Engineering, Kindai University, [2]Department of Biotechnology and Chemistry, Faculty of Engineering, Kindai University, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Kindai University, [4]Department of Biological and Environmental Chemistry, Faculty of Humanity-Oriented Science and Engineering)

【目的】
近年の日本は出生率が低く，高齢者人口の多い超高齢化社会を迎えている．そのため今後増加する高齢者に配慮した食品の需要は増すばかりとなるだろう．人は年齢を重ねると，筋力の低下が起こる．この筋力の低下が食べ物を摂取する機能（嚥下能）を低下させる．これにより誤嚥が発生し，誤嚥が続くことで食欲が減退し低栄養状態となったり，誤嚥性肺炎が誘発される．現在の高齢者食品は，栄養を強化した食品と疾病の予防・改善，老化防止を目的とした食品に分類されるが，いずれも高齢者食品に特有の形態や物性，味などに対する工夫が重要課題となる．嚥下困難者には均質で滑らか，かつまとまり感のある食品が有効であり，嚥下が容易で誤嚥を防ぐことのできるような適度な物性を有する食品が求められる．脂質は三大栄養素の一つであり，食品の一次，二次および三次機能においてバランスのとれた優れた食品成分であるが，その安定性や水系食品での利用性の低さから高齢者用食品に用いられている例は少ない．本研究では，機能性脂質を含んだハイドロゾルを調製し，その安定性について検討した．
【実験方法】
6，7 および 8%(w/v)柑橘由来ペクチン水溶液を調製し，所定量の 1%(w/v)グリセリンモノラウレート水溶液および大豆油を加え，ロータ/ステータ式ホモジナイザを用いて乳化した．その後，所定の温度および相対湿度において調製したハイドロゾルを保存し，その油滴粒子径をレーザー回折式粒度分布測定装置にて，また流動特性を回転式粘度計にて，さらに硫酸アンモニウム鉄(Ⅱ)-ヨウ化カリウム処理を加えて分光光度計にて過酸化物価を測定した．
【結果および考察】
ペクチン濃度が高いほどハイドロゾルの粘度は高く，いずれのペクチン濃度においてもハイドロゾルの粘度はペクチン水溶液に比べ高かった．そして，せん断速度が上昇するといずれの粘度も低下する傾向が示された．また，保存過程においてハイドロゾルの粘度低下が観察された．ペクチン濃度が高いほどハイドロゾル中の初期油滴粒子径が小さくなり，酸化安定性は低下した．ハイドロゾルの流動特性パラメーターと酸化速度定数の関係から，ハイドロゾルの粘性が脂質の酸化安定性に寄与し，そしてせん断式乳化における発熱が脂質酸化に影響する可能性が示唆された．

Lipid hydrosol, Rheological property, Stability

発表責任者：渡邉義之（wysk@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：2B10a13
講演日時：3 月 16 日 11:32～ 共通講義棟南 B10 会場

貯蔵条件の異なるリンゴ‘ふじ’における褐変の発生とその揮発性バイオマーカーの検索
Screening of volatile biomarkers for apple browning after long term storage under different conditions

○田中 福代[1]、立木 美保[2]、松原 和也[3]、岡崎 圭毅[1]、葛西 智[4] ([1]農研機構中央農研、[2]農研機構果樹茶部門、[3]立命館大、[4]青森産技セりんご研)
○Fukuyo TANAKA[1], Miho TATSUKI[2], Kazuya MATSUBARA[3], Keiki OKAZAKI[1], SATOSHI KASAI[4] ([1]CARC NARO, [2]NIFTS NARO, [3]Ritsumei Unv., [4]Apple Research Institute, AITC)

【目的】リンゴは長期貯蔵技術が確立しており，国産果実による周年供給が実現している．リンゴの長期貯蔵には CA（Controlled atmosphere）貯蔵と呼ばれる，酸素分圧を低下させ，二酸化炭素分圧を上昇させる技術が一般的に用いられており，さらに，鮮度保持剤 1-MCP（1-methylcycropropene）処理の適用も増加している．両技術ともにエチレンによる軟化を抑制し，呼吸による消耗を減少させることにより果実の品質を維持するものである．しかし，このような長期貯蔵法は果肉の褐変(内部褐変)を生じ，商品価値を損なうことが問題となっている．内部褐変は品種により発生程度が異なり，また，CA 貯蔵と 1-MCP 処理に対する応答も異なるなど，未解明の点が多く，その発生メカニズムの解明と，褐変個体の早期判定技術が求められている．そこで，この障害を生じやすい‘ふじ’を供試し，非破壊で捕集した揮発性成分と内部褐変の発生の相関から，褐変と関連する成分(バイオマーカー)のスクリーニングを試みた．また，得られたバイオマーカー候補について，次年度産の果実を用いて検証を行った．

【方法】青森県産技セりんご研内圃場（青森県黒石市）で生産した‘ふじ’を供試した．**マーカー成分のスクリーニング**：2014 年産果実．貯蔵条件の処理区は 1）CA 貯蔵：CAL（CO_2:1.5%，O_2:2.2%），2)高 CO_2-CA 貯蔵：CAH（5.0%，2.2%），3）普通冷蔵：CON，4)普通冷蔵+１-MCP 処理：MCP とし，貯蔵温度はいずれも０℃とした．2013 年は CAL と CAH の 2 区，2014 年は全 5 処理区について調査した．香気成分は，1 果ずつ捕集剤とともに 1.2L のガラス製密閉容器に室温で 1 時間静置により捕集し，TDU-GC-MS 分析を行った．その後，果実を水平方向に切断し，そのスキャン画像から果肉褐変程度を評価した．**検証実験**：2015 年産果実．果実を採取後 CAL 条件で 3 月末まで貯蔵し，大気条件下に移動し４℃で５月まで貯蔵した後，香気成分の分析と褐変程度の評価を行った．

【結果】マーカー成分のスクリーニング：貯蔵条件により褐変程度は異なり，CAH で最も早く進行し，CON と MCP は遅く近似の経過を示した．CA および MCP 貯蔵期間が長くなると，揮発性成分は全体的に減少する傾向が認められた中で，2-メチル酪酸，ヘキサン酸，酪酸のメチルエステルは褐変が進行している時期に褐変程度との正の相関を示したことから，これらを褐変のバイオマーカー候補として検証を行うこととした．検証実験：2015 年産の果実(35 個×2 反復)を用いて，個体ごとに褐変面積とメチル 2-メチル酪酸のピーク強度を比較した．その結果，いずれも $p<0.001$ の有意な正の相関が認められた．

Apple browning, Long term storage, Volatile biomarkers

発表責任者：田中 福代（fukuyot@affrc.go.jp）

講演番号：2B10p01
講演日時：3 月 16 日 14:00～ 共通講義棟南 B10 会場

γ Cyclodextrin と Forchlorfenuron の固体分散体による物性評価
To study of Physicochemical properties of γCyclodextrin / Forchlorfenuron solid dispersion
○平野 愛、恵沢 敏成、鈴木 莉奈、村田 勇、井上 裕、古旗 賢二、金本 郁男（城西大薬）
○Ai HIRANO, Toshinari EZAWA, Rina SUZUKI, Isao MURATA, Yutaka INOUE, Kenji KOBATA, Ikuo KANAMOTO (Josai Univ.)

【目的】農作物などの成長や発育を人為的にコントロールし、品質の向上や収量の増加、生産上の労力の省力化などに用いる農薬として植物成長調整剤がある。その中で特に着粒促進や果実肥大の作用をもつ化合物としてホルクロルフェニュロン(CPPU)が知られている。しかし、現在植物成長調整剤として販売されている商品は有機溶媒に溶解されており、含有成分のほとんどをこの有機溶媒と界面活性剤が占めていること、溶液剤であることから流通上の負担が大きいなどの問題点が挙げられる。そのため、CPPU を粉体にて流通ができ、適切な濃度に調製することができれば、使用感の向上に繋がるものと期待される。そこで本研究ではシクロデキストリン(γCD)と CPPU との包接複合体を形成することができれば、CPPU の利用の拡大につながるものと期待できることから、その包接複合体の物理化学的特性、分子間相互作用および溶出性について評価を行った。
【方法】CPPU と γCD をモル比 1/1 になるように物理的混合物(PM)、混合粉砕物(GM)、共沈物(CP)の固体分散体を調製した。溶解度相図を Higuchi と Connors の方法に従って作成して包接モル比を確認し、示差走査熱量(DSC)測定、粉末 X 線回折(PXRD)測定、赤外(IR)吸収スペクトル測定によって相互作用の確認を行った。また、^{1}H-^{1}H NOESY NMR 測定により包接様式の確認と、溶出試験から包接複合体の形成による溶解特性を検討した。
【結果・考察】溶解度相図より CPPU の溶解度が直線的に増加したことから水溶液中の CPPU/γCD の包接モル比は 1/1 であった。DSC 測定では CPPU intact で観察された 175ºC 付近の融解による吸熱ピークが PM では観察されたのに対し、GM 及び CP では吸熱ピークが消失した。PXRD 測定では CPPU intact および CPPU 粉砕物で観察された CPPU 由来の回折ピークと γCD 由来の回折ピークが PM では観察されたのに対し、GM 及び CP では包接に由来する特徴的なピークが確認された。IR スペクトル測定では GM および CP において、CPPU の芳香環由来のピークが低波数側にシフトしたことから γCD と CPPU が相互作用しているのではないかと推察した。^{1}H-^{1}H NOESY NMR 測定では CP において、γCD と CPPU の芳香環部分とのクロスピークが確認され、CPPU は γCD の環の広い縁から狭い縁に向かって芳香環部分から包接されていると推察した。溶出試験の結果からは GM 及び CP において CPPU intact および PM と比較し高い溶出性を示した。以上の結果より CPPU と γCD の包接複合体形成により溶解性の向上が確認され、これは CPPU の植物成長調整剤としての利用拡大の可能性を示している。

γ Cyclodextrin, Forchlorfenuron, solid dispersion

講演番号：2B10p02
講演日時：3 月 16 日 14:11～ 共通講義棟南 B10 会場

γ-シクロデキストリンを用いた還元型コエンザイム Q10 包接複合体の調製
Preparation of reduced form of coenzyme Q10 inclusion complex by using γ-cyclodextrin
○上梶 友記子、寺尾 啓二 (シクロケムバイオ)
○Yukiko UEKAJI, Keiji TERAO (CycloChem Bio)

【背景・目的】
コエンザイム Q10 (CoQ10) はミトコンドリアにおけるエネルギー産生に関与する補酵素であり、酸化型 (ユビキノン) と還元型 (ユビキノール) の 2 つの形態が存在する。どちらの CoQ10 も水に極めて溶解しづらく、その低い生物学的利用能は解決すべき課題である。これまでに、我々は γ-シクロデキストリン (γ-CD) の包接化による酸化型 CoQ10 の水への溶解性および生物学的利用能の向上を報告している。還元型 CoQ10 は生体内で強い抗酸化作用を発揮するが、酸素に対して非常に不安定であり、取り扱いが困難である。そこで本研究では、食品添加物で還元剤として使用されている亜ジチオン酸ナトリウムを使用し、酸化型 CoQ10 から還元型 CoQ10-γ-CD 包接複合体を調製し、その物性評価を行った。
【方法】
還元型 CoQ10-γ-CD 包接複合体の調製は、脱気水に亜ジチオン酸ナトリウムを溶解し、酸化型 CoQ10-γ-CD 包接複合体を加え、窒素雰囲気下の 25~80°C で加熱撹拌した。この時、所定時間毎に試料を採取し、高速液体クロマトグラフにて還元型 CoQ10 への変換率を確認した。乳化液中の亜ジチオン酸ナトリウムを脱気水で洗浄した後、凍結乾燥にて粉末化した。得られた包接複合体粉末中の CoQ10 含量を測定すると共に、その酸化安定性および人工腸液への溶解性を評価した。
【結果】
乳化液中の還元型 CoQ10 の割合は、亜ジチオン酸ナトリウムの添加によって 80ºC の条件下で 30 分後には 98 %以上を示した。反応温度が高くなるにつれ、還元型 CoQ10 への変換率も高くなる傾向にあった。また、得られた粉末に対して熱分析による評価を行ったところ、CoQ10 由来のピークが消失したことから、還元型 CoQ10-γ-CD 包接複合体を形成していることが示唆された。粉末中の総 CoQ10 含量は 13~15 %であり、その還元型 CoQ10 の割合は 97~98 %であった。酸化安定性の評価では、既報の還元型 CoQ10 原末のデータと比較して改善していることが確認された。また、人工腸液への溶解性に関しては、酸化型 CoQ10-γ-CD 包接複合体 (市販品) と比較して高い溶解性が認められた。
以上の結果より、還元剤として亜ジチオン酸ナトリウムを用いることで酸化型 CoQ10 から還元型 CoQ10 に変換され、γ-CD によって安定化できることが確認された。また、人工腸液への優れた溶解性から経口吸収性の向上も予想され、健康食品素材への応用が期待される。

cyclodextrin, coenzyme Q10, reduction

発表責任者：上梶友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：2B10p03
講演日時：3 月 16 日 14:22～ 共通講義棟南 B10 会場

超臨界二酸化炭素抽出法を用いたクレソンに含まれる機能性成分の分析

Glucosinolates, isocyanates, isothiocyanates and ureas in SFE extract from watercress

○中屋 慎[1,2]、小谷口 美也子[2]、庄條 愛子[3]、水野 淨子[3]、北村 進一[1]([1]大阪府立大学、[2]（有）IPE、[3]相愛大学)
○Makoto Nakaya[1,2], Miyako Kotaniguchi[2], Aiko Shojo[3], Seiko Mizuno[3], Shinichi Kitamura[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]IPE. Inc., [3]Soai Univ.)

葉物野菜として知られるクレソン（オランダガラシ，*Nasturtium officinale*）は血圧上昇抑制効果などの生活習慣病予防・改善効果が知られており，一般的に，この効果は植物体内に蓄積されるグルコシノレートや，その代謝物であるイソシアネート(IC)，イソチオシアネート(ITC)に因ると解釈されている。しかし，グルコシノレートは内在性の分解酵素により速やかに IC や ITC へと分解される点，生成した IC や ITC は反応性が高くアミンや水などと容易に反応する点を考慮すると，これらの物質が直接ヒトの体内に吸収され活性を示すかについて検証すべき余地が十分にある。近年，血圧上昇に関与する可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)について，IC，ITC とアミンの反応物であるウレアはグルコシノレートや ITC に比べ阻害活性が高いことが報告された[1)]。クレソンの機能性とその関与成分を評価するためには，グルコシノレートや IC，ITC に加え，その代謝物であるウレアに着目した分析が必要である。しかし，これらの物質は植物体内における含量が極微量である上，分解性，反応性，揮発性などが高いため，研究の遂行には抽出法および分析法の構築が非常に重要なとなる。

我々は超臨界流体抽出法(Supercritical Fluid Extraction, SFE)と LC-MS^2 分析法を組み合わせた抽出・定量法を構築した。SFE とは，固体試料に抽出溶媒として超臨界流体を加え，液体溶媒より強力な溶出力で目的物質を抽出する方法である。本研究では，超臨界二酸化炭素を用いることで酵素反応や酸化を抑制しつつ，モディファイヤとしてエタノールを段階的に添加することで極性の異なる物質を効率良く抽出することに成功した。この方法は，クロロホルムやメタノールなど有機溶媒を用いる従来の抽出法に比べ抽出物中への溶媒の残留が無く濃縮操作が簡便であるため，高揮発性・易反応性の微量物質の抽出に適している。抽出物に含まれる物質の同定及び定量は LC システム Shimadzu Prominence とイオントラップ型 MS Thermo Finnigan LCQ Advantage MAX を用いた HPLC-ESI-MS^2 法による選択反応モニタリング(SRM)により行った。クレソン凍結乾燥粉末を分析したところ，特徴的なグルコシノレートとして Gluconasturtiin が検出された。さらに，Gluconasturtiin から生成することが予想される 1,3-Diphenetylurea が豊富に含まれることが分かった。1,3-Diphenetylurea は sEH 阻害活性が高いウレアであることから，クレソンが示す効果の主因物質である可能性がある。

1) Seiya Kitamura, et al., Occurrence of urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors from the plants in the order Brassicales, PLoS ONE, 12(5), e0176571.

Watercress, Ureas, Supercritical Fluid Extraction

発表責任者：中屋　慎（nakaya@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2B10p04
講演日時：3 月 16 日 14:33～ 共通講義棟南 B10 会場

ヘルムホルツ共鳴を用いたビール泡の品質評価に関する研究

Study on quality evaluation of foam on beer using Helmholtz resonance

○上田 裕紀[1]、西津 貴久[1]、勝野 那嘉子[1]、磯江 晃[2]、畑中 一成[2]([1]岐阜大学、[2]サントリービール株式会社)
○Yuki Ueda[1], Takahisa Nishizu[1], Nakako Katsuno[1], Akira Isoe[2], Kazushige Hatanaka[2] ([1]Gifu Univ., [2]Suntory Co., Ltd.)

【目的】

ビールの泡には苦味を抑えまろやかにして口当たりを向上させるとともに,炭酸抜けを防ぎおいしさを保たせる効果があると言われており,泡の品質はビールの評価に関わる重要な因子である.泡の品質評価法として送気法やロスマイルス改良法があるが,起泡力・泡安定度しか測定できないことやコップに注いだ実際の系で測定できないことが問題点として指摘されている.これらの問題点を解決するために，当研究室ではヘルムホルツ共鳴を利用した泡の評価法について検討してきた.共鳴周波数は泡量や気泡径の分布により共鳴周波数がシフトするが，これは気泡の吸音性によることが明らかになっている．そこで共鳴器内の圧力―体積変動がエネルギー散逸のあるポリトロープ変化であると仮定し，泡量や気泡径分布がポリトロープ指数に及ぼす影響について検証することとした.

【実験方法】

泡立ちや泡もちの異なる 2 種類の市販ビール系製品を試料とした．水 120 mL の上に炭酸ガス起泡(NIBEM 装置)により生成した泡を載せ,ヘルムホルツ共鳴器と動的フォームアナライザー（KRÜSS 製, DFA100）を組み合わせた装置を試作し，泡が消失するまでの共鳴周波数と泡の体積,泡数,泡径の時間的変化を測定した.得られた共鳴周波数からポリトロープ指数を算出した.気泡内圧より高い音圧が気泡膜を振動させることにより音響エネルギー損失が生ずるものとして,Young-Laplace の式により泡径と泡数のヒストグラムから気泡内圧を求めエネルギー損失量を算出した.試料について Kjeldahl 法によるタンパク質測定,フェノール硫酸法による全糖量測定，懸滴法による表面張力測定をおこなった.

【結果・考察】

エネルギー損失量とポリトロープ指数の間には負の相関がみられた.2 種類のサンプルではこの関係式は一致せず,気泡径と泡量から求めた損失エネルギーが同じでも,泡立ち・泡持ちの良いビールの方がポリトロープ指数は大きくなった.泡立ち・泡持ちの良いビールはタンパク質,糖質の濃度が大きいことから気液界面にこれらの成分がより多く存在することで，音圧による振動を抑制し，エネルギー損失が小さくなって，共鳴周波数が高くなるものと推察される.

foam, beer, resonance

発表責任者：上田裕紀（t8024008@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2B10p05
講演日時：3 月 16 日 14:44～ 共通講義棟南 B10 会場

Determination of apparent Tg characterized by flavor release from emulsified flavor powders and yeast cells using aroma sensor

○Afroza SULTANA[1,2,3], Jian Long Zhu[1], Hidefumi Yoshii[1,2] ([1]Kagawa Univ., [2]UGAS, Ehime Univ., [3]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ.)

[Purpose] Encapsulation acts as the protecting barrier of liquid flavor that increases the stability and free flowing properties of liquid flavor by converting liquid to solid powder. Wall material of encapsulated powder protects the core material from oxygen, air, light and moisture. Glass transition temperature (T_g) is one of the important phenomena that affect the flavor release from the flavor encapsulated powder. Additionally, final product quality and stability also depends on T_g. Usually, differential scanning calorimetry (DSC) is used to measure T_g. However, it is very difficult to identify T_g due to the small heat capacity of DSC. In this study, T_g of flavor encapsulated powders was measured with different wall materials (MD, MD with 20% and 40% fructose and *Saccharomyces cerevisiae* cells) using aroma sensor.

[Materials and Methods] Flavors (1-hexanol and mixed flavor contained of 1-hexanol, benzaldehyde, *d*-limonene, ethyl laurate and ethyl hexanoate) was encapsulated by 2 steps as homogenization and spray drying for preparing emulsified flavor powder with a solid content of 50 wt%. Three different wall materials such as MD (DE=19), the blending of MD and fructose (Fr) with wall ratio 4:1 and 3:2 were used to prepare emulsified flavor powders. Sodium caseinate as emulsifier with 3 wt%, flavor with 20 wt% of total solid were added to prepare emulsion. Yeast cells were used as wall material to encapsulate *d*-limonene with 25 wt% solid content with the ratio of yeast to flavor 2:1. One gram of emulsified flavor powders and yeast powder was put in a glass vessel ($24^d \times 45^h$), and covered with a rubber cap. The cap had 2 needles where one was the air supply port and another one was the air sampling port. The air sampling port was connected to the handheld odor meter (KANOMAX, OMX-SRM model, Kobe, Japan) with a poly-urethane tube (PISCO, Okayama, Japan). The release of flavor was detected by the aroma sensor. The exhaust nozzle of the odor meter was connected to the air sampling pump (SP 208 Dual, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) maintaining the air flow rate 50 mL/min. The vessel was put in an aluminum block on the digital plate heater. The plate heater was used to control the ramping temperature of powder with an increment rate (0.5 and 1°C/min). The powder temperature was recorded with the data logger. A data filing software of OMX-SRM was installed in the computer to collect the released flavor.

[Results and discussions] The intensity of flavor release increased rapidly above the specified temperature, which is the intercept temperature of tangent lines of flavor as the apparent glass transition temperature for wall material. The apparent T_g for flavor encapsulated MD, MD with 20% and 40% fructose was about 130, 110 and 75°C, respectively. These apparent T_g were the closed value of the calculated T_g with Gordon-Taylor equation. On the other hand, flavor release was very slow from flavor encapsulated yeast cells. The intercept point was near about 200°C. This might be due to the presence of mechanically strong cell wall of the yeast.

apparent glass transition temperature, encapsulated flavor powders, aroma sensor

発表責任者：Hidefumi Yoshii（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B10p06
講演日時：3 月 16 日 15:05～ 共通講義棟南 B10 会場

1 級溶媒と分取セルを利用した HPLC-UV 分析・分取

Analysis and preparative isolation of the HPLC-UV method using 1st grade solvent and preparative uv-cell

○松本 恵実、中塚 宏志、中塚 進一（長良サイエンス（株））
○Emi Matsumoto, Hiroshi Nakatsuka, Shin-ichi Nakatsuka (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】HPLC-UV 検出器は、HPLC 分析・分取する際の検出器として、広く利用されている。この検出器では、190～900nm 等の紫外・可視域の光を吸収する化合物を検出できる。使用する溶離液は、測定波長の光を十分透過する溶媒を選択する必要がある。溶媒のグレードは、1 級、特級、HPLC 用が市販されており、HPLC 分析・分取の際は、HPLC 用の溶媒が推奨されている。しかしながら、HPLC 用の溶媒は、1 級、特級溶媒よりも高価であるため、特に大量に使用する大量分取には使用しにくい。そこで、私たちは、各グレードの溶媒の紫外可視吸収スペクトルを測定し、安価に分析・分取する方法について検討した。

【結果】HPLC で使用する溶媒の、各グレードの紫外可視吸収スペクトルを比較したところ、アセトニトリルにおいては、240nm 付近よりも短波長では、グレードが高くなるにつれ、吸光度が低かった。しかしながら、メタノールにおいては、グレードによる大きな違いは見られなかった。

また、紫外可視吸収スペクトルの光路長を、10㎜ と 1㎜ とで比較したところ、HPLC 用の溶媒を光路長 10㎜ で測定した場合よりも、1 級溶媒を光路長 1㎜ で測定して得られた吸光度の方がはるかに低かった（図）。私たちは、これまでに、UV 検出器において 0.05㎜ 等の厚みの改造セルを用いた、HPLC 定量分析法を開発して報告してきた*。この方法は、特徴的な UV 吸収を持たない化合物でも、単独の C=C, C=O 等の二重結合やカルボキシル基、水酸基等が存在すれば、200nm 付近の UV エンド吸収領域の紫外線を強く吸収することを利用した分析法である。この方法では、UV 検出器の分析セルの厚みを通常の 10㎜ 等から 0.05㎜ 等に薄くすることで、溶媒自身や共存する不純物の光の吸収に影響を受ける UV エンド吸収領域での分析を可能にしている。本研究により、UV 検出器のセルの厚みを薄くし、分析試料量を増やすことができれば、1 級溶媒でも分析が可能であり、これまでに報告してきた方法の有効性を裏付けることができた。

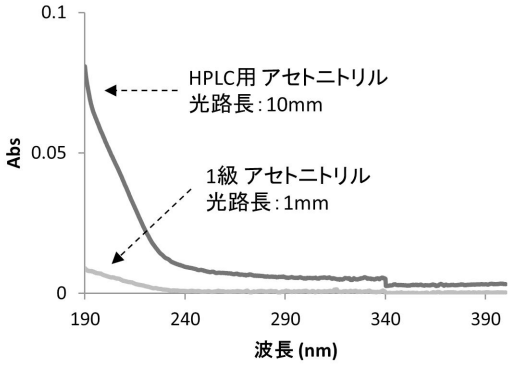


図 紫外可視吸収スペクトルの比較
（試料濃度:試料 約0.1ml／10ml 水）

＊松本恵実, 中塚進一ら, セラミド研究会 第 5 回学術集会(2012).,
FOOD Style 21, 17(3), 87-89 (2013), 食品化学新聞社.,
日本農芸化学会 2017 年度大会.

hplc, analysis, preparative isolation

発表責任者：中塚　進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：2B10p07
講演日時：3 月 16 日 15:16～ 共通講義棟南 B10 会場

近赤外スペクトルによるスティックコーヒー原料混合比率の迅速分析：水分含量の影響

Blend Monitoring of a Soluble Coffee Premix Product by Near Infrared Spectroscopy: Effects of water content

○阪口 宗[1]、石川 裕[1]、金谷 克彦[1]、長谷川 淳治[1]、山本 信彦[2]、中村 岳幸[2]、貝島 健太[2]、萩原 知明[1] ([1]海洋大海洋科、[2]東洋ハイテック)
○ Muneto SAKAGUCHI[1], Yutaka ISHIKAWA[1], Katsuhiko KANATANI[1], Junji HASEGAWA[1], Nobuhiko YAMAMOTO[2], Takeyuki NAKAMURA[2], Kenta KAIJIMA[2], Tomoaki HAGIWARA[1] ([1]Kaiyo Univ. Kaiyo, [2]Toyohitech)

【背景・目的】
近年、消費者からのクレームが SNS 等で広がり、食品企業のイメージに大きな影響を与えている。このような時代であるからこそ、食品企業としては、食品安全はもとより、商品の品質に対しても消費者からの提起品が規格内に入っていることを客観的に証明する必要がある。
そのための取組みの一つとして、現在市場の伸びているスティックコーヒー（インスタントコーヒー、クリーミングパウダー、グラニュー糖の混合物）の風味クレームを対象に、指摘商品の混合状態が規格通りの混合比率になっていることを客観的な方法で迅速に解析するための手法として、我々は近赤外スペクトルによる混合比率の迅速検査法の開発に取り組んできた (阪口ら, 2012 年日本食品工学会第 13 回年次大会)。本研究では、測定精度の向上を目的として、製品の水分含量が混合比率の測定結果におよぼす影響を調べた。
【方法】
インスタントコーヒー（ブレンディ、味の素ゼネラルフーヅ）とコーヒー用クリーミングパウダー（マリーム、味の素ゼネラルフーヅ)、グラニュー糖（GN、三井製糖）を混合して実験に供した。NIR 分光分析用試料として、上記 3 種の原料を合計 15 g 程度となるように混合し、乳鉢で 200 回（約 2 分）挽いて粉砕した。NIR スペクトルの測定には近赤外分析装置 Spectra Star 2400-RTW（Unity Scientific, CT, USA）を用いた。試料約 7 g を測定用容器（内径 38.5 mm、高さ 27.0 mm）に入れ、容器を自動回転させながら、波長 1200 nm～2400 nm における NIR スペクトルを測定した。試料の水分含量は常圧加熱法で測定した。
【結果・考察】
粉体混合試料の水分含量を考慮しない場合、測定値と実際の混合比率に大きな乖離があった。NIR スペクトルに対する粉体混合試料の水分およびその含量の寄与を考慮することで、原料であるインスタントコーヒー、クリーミングパウダー、グラニュー糖の混合比率を比較的良好な精度で求めることができた。（インスタントコーヒーの検量線の決定係数：R2=0.9783、クリーミングパウダーの検量線の決定係数：R2=0.9636、グラニューの検量線の決定係数：R2=0.9291、水分の検量線の決定係数：R2=0.9583）本研究の手法は、他のスティック飲料製品にも適用できる可能性が高く、粉体混合製品の品質管理に有用であると考えられる

rapid analysis, mixed state, near-infrared spectroscopy

講演番号：2B10p08
講演日時：3 月 16 日 15:27～ 共通講義棟南 B10 会場

分光学的手法を用いた固体食品表面の水分活性モニタリング

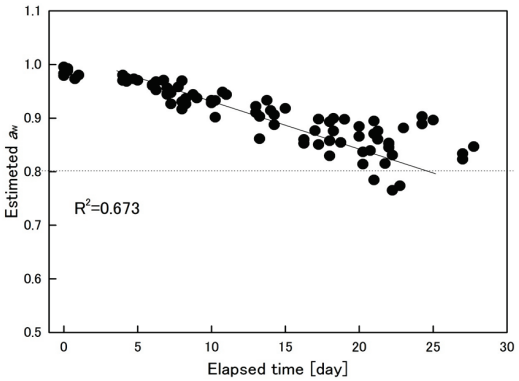
Monitoring of water activity at the surface of solid food by spectroscopic technique

○石川 大太郎[1]、上野 源次郎[2]、藤井 智幸[1] ([1]東北大院農、[2]日本ハム(株))
○Daitaro Ishikawa[1], Genjiro Ueno[2], Tomoyuki Fujii[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NH Foods Ltd.)

［緒言］
ハードタイプのチーズなど、固体表面上に微生物を増殖させることによって製造する発酵食品の例は多い。このような発酵食品の製造工程においては、微生物制御の観点から、固体表面の水分活性を把握することが重要である。しかし現状の製造工程では、発酵食品に限らず食品表面の水分活性はほとんど把握されていない。これは、製造工程に導入しうる非破壊的な水分活性モニタリング技術が確立されていないためと考えられる。
そこで本研究では、近年新しい食品素材として注目されている醸成肉を取り上げ、可視・近赤外分光分析を用いた固体表面の水分活性モニタリング法の確立を目的として実験を行った。まず極薄のスライス肉片より得られた分光スペクトルから、水分活性に対応する分光マーカーを探索し、次に肉塊を対象として固体表面の水分活性非破壊モニタリング手法について実験的な検討を試みた。

[実験方法]供試材料は、ショルダークロッド(タンパク質：22%、脂質 4%、ナトリウム 0.52%)を用いた。2-4mm の厚さに調製したスライスサンプルと 80mm 厚の肉塊を準備した。スライスサンプルでは乾燥過程に伴って、可視・近赤外スペクトル、含水率および水分活性を測定した。肉塊は、庫内相対湿度 80%、庫内温度 4℃で 27 日間乾燥を行い、乾燥過程中に近赤外分光測定を実施した。

[結果および考察]
スライスサンプルの可視・近赤外スペクトル測定から、680nm 付近にミオグロビンに由来するスペクトルと 960nm 付近に水分に由来するバンドを確認した。960nm 付近のスペクトルの二次微分値は含水率変化を示した(R^2=0.81、RMSE=0.34g/g-d.s.)。また含水率と水分活性の関係は、GAB 式によって良好に記述された(RMSE：0.35g/g-d.s.)。
肉塊のスペクトル測定では、固体表面のスペクトルを高精度で取得するため、光路長と露光時間、露光面積を実験的に最適化した。
近赤外スペクトルの変化から推定された肉塊の表面含水率は、乾燥期間全体では指数関数的に変化し、定率乾燥期間は認められなかった。そして、表面水分活性推定値は、乾燥開始時から直線的に減少する傾向が得られ(R^2=0.67)、乾燥期間 22-25 日付近で a_w =0.8 に到達することが明らかとなった。以上の結果から、牛肉の乾燥過程における表面水分活性の非破壊推定が可能であることが示された。



牛肉表面の水分活性推定値の経時変化

Aging beef, NIR spectroscopy, Water activity

講演番号：2B10p09
講演日時：3 月 16 日 15:38～ 共通講義棟南 B10 会場

アセチルアセトン誘導体化法および GC-MS を用いた迅速かつ選択的な食肉・食鳥肉中の次亜臭素酸および次亜塩素酸定量法の検討

Rapid and selective determination of hypobromous acid and hypochlorous acid on meat and poultry using acetylacetone derivatization and GC-MS

○鈴木 一平[1,2]、久保田 浩樹[1]、建部 千絵[1]、多田 敦子[1]、佐藤 恭子[1] ([1]国立医薬品食品衛生研究所、[2]国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所)
○Ippei SUZUKI[1,2], Hiroki KUBOTA[1], Chiye TATEBE[1], Atsuko TADA[1], Kyoko SATO[1] ([1]National Institute of Health Sciences, [2]National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

次亜臭素酸水は次亜臭素酸 (HOBr) を主成分とする水溶液であり、食品の表面に用いられる殺菌料である。我が国では平成 28 年 10 月に殺菌料として指定され、その使用は食肉および食鳥肉の殺菌に限定されている。一方、次亜塩素酸（HOCl）を有効成分とする次亜塩素酸ナトリウムは、古くから殺菌料として使用されており、ゴマへの使用が禁じられている以外には殺菌対象の制限はない。HOBr および HOCl は対象食品により規制が異なることから、食品中の HOBr および HOCl をそれぞれ特異的に定量可能な分析法が必要と考えられた。HOBr および HOCl の簡易分析法としては、ジエチルパラフェニレンジアミン（DPD）による比色定量法やヨードメトリーを利用した滴定法などが知られているが、これらはハロゲン酸化物との酸化還元反応を利用して定量するため、HOBr と HOCl を判別できない。そこで、食肉および食鳥肉中の HOBr、HOCl の分別定量法について検討を行った。

アセチルアセトンを用いた誘導体化による試料調製とガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）を組み合わせた分析法の検討を行った。試料調製法の検討の結果、誘導体化反応の溶媒として pH2.0 のリン酸緩衝液が最も適しており、アセチルアセトンによる誘導体化に必要な反応時間は 3 分程度と短時間であった。また、測定条件の検討の結果、誘導体化により生じた 3-bromo-2,4-propanedione (*m/z*163) および 3-chloro-2,4-pentanedione (*m/z*119) を、内部標準法を用いた GC-MS により分析することで、分別定量が可能であることが示された。定量下限値は HOBr で 3 mg/kg、HOCl では 0.5 mg/kg であった。また、牛肉、豚肉および鶏肉に HOBr もしくは HOCl を添加し回収試験を行った (100 mg/kg または 1,000 mg/kg 添加)。その結果、HOBr の回収率は 64.5~99.5%、相対標準偏差 (RSD) は 4.5~12.8%であり、HOCl の回収率は 70.5~87.0%、RSD は 3.7~11.7%であった。また、牛肉を試料として 2 濃度での添加回収試験 (100 mg/kg または 1,000 mg/kg 添加） を 1 日 2 併行かつ独立した 5 日間行い、分析法について検討した結果、HOBr および HOCl を用いたすべての試験において回収率は 84.9~95.8%の範囲内であった。また、併行精度 (RSD_r) および室内精度 (RSD_R) はそれぞれ 11.2、12.1%以下であり、HOBr および HOCl は分解し易いことが知られているものの、本法の回収率・精度はともに良好と考えられた。また、実際に殺菌に使用される濃度の HOBr および HOCl によって模擬的に殺菌処理を行った牛肉、豚肉および鶏肉に対して、殺菌直後の残留量を本法を用いて測定した結果、牛肉、豚肉および鶏肉において、HOBr は 6.9~22.2 mg/kg、HOCl は 11.9~15.1 mg/kg であった。本法は食肉・食鳥肉中の次亜臭素酸および次亜塩素酸の分別定量法として非常に有用であると考えられた。

Hypobromous acid, Hypochlorous acid, GC-MS

講演番号：2B10p10
講演日時：3 月 16 日 15:49～ 共通講義棟南 B10 会場

自己駆動型クーロメトリーを用いた過酸化水素の定量法の開発とその応用

Development of hydrogen peroxide determination method using self-driven coulometry and its application

○三木 功次郎、古辻 ななみ、北村 誠、石丸 裕士 (奈良高専)
○Kojiro MIKI, Nanami FURUTUJI, Makoto KITAMURA, Hirohito ISHIMARU (NIT, Nara College)

【目的】クーロメトリーは，電解反応によって流れた電気量を測定することで目的物質の絶対量を測定できる方法である。さらに，作用極に注入した試料物質と対極に含まれる電池活物質との酸化還元電位の差を駆動力として，電池と同様に自発的に放電電流を発生させ，電解に電源を必要とせずに測定ができる自己駆動型クーロメトリー法が報告されている[1)]。本研究では，この自己駆動型クーロメトリーを用いた過酸化水素の定量法の検討を行い，その応用としてアスコルビン酸の測定を試みた。

【実験】アクリル樹脂性の透析セルを加工してクーロメトリックセルとして用い，作用極および対極にはカーボンフェルト（約5 cm^3）を用い，陽イオン交換膜で両極を隔てた。作用極にはリン酸緩衝液（pH6.0），対極にはNADH，ジアホラーゼ（DI）およびジアホラーゼの電子受容体として2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p*-ベンゾキノン（UQ_0）を含むリン酸緩衝液（pH6.0）を用いた。作用極と対極の間に抵抗を接続して，デジタルボルトメーターを用いて電流を測定して，電気量を求めた。

【結果・考察】対極ではNADHがジアホラーゼにより酸化されて，還元型のUQ_0が生成する。ここで作用極に$K_3[Fe(CN)_6]$を含む溶液を10 μL添加すると，$[Fe(CN)_6]^{3-}$と還元型UQ_0の酸化還元電位の差による自己駆動によって電解電流が流れ，添加した$K_3[Fe(CN)_6]$のモル数によく一致した電気量が得られた。パーオキシダーゼ存在下で，$K_4[Fe(CN)_6]$はH_2O_2により$K_3[Fe(CN)_6]$に酸化されることが知られている[2)]。そこで，パーオキシダーゼおよび$K_4[Fe(CN)_6]$を含む溶液にH_2O_2を添加して，30℃で一定時間反応させて，酵素反応が終了した溶液を作用極に10 μL添加したところ，その電解電流よりH_2O_2量を測定することができた。また，H_2O_2を生成するアスコルビン酸オキシダーゼをアスコルビン酸水溶液に作用させてH_2O_2を生成させた後，パーオキシダーゼと$K_4[Fe(CN)_6]$を添加して作用極に添加して，アスコルビン酸濃度を測定することができた。本法は濁度の影響を受けないため，迅速・簡便・安価な測定法として期待できる。

1）内山俊一 編，高精度基準分析法クーロメトリーの基礎と応用，学会出版センター，1998
2）T. Ikeda, T.Shiraishi and M. Senda, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3187, 1988

coulometry, hydrogen peroxide, ascorbic acid

発表責任者：三木功次郎（miki@chem.nara-k.ac.jp）

講演番号：2B10p11
講演日時：3 月 16 日 16:10～ 共通講義棟南 B10 会場

混合粉砕物による γ Cyclodextrin と Daidzein の物性評価

To evalation of physicocemical properties between γCyclodextrin and Daidzein by cogrinding

○長田 麻衣、鳴海 祥恵、恵沢 敏成、鈴木 莉奈、村田 勇、井上 裕、古旗 賢二、金本 郁男 (城西大薬)
○MAI OSADA, SACHIE NARUMI, TOSHINARI EZAWA, RINA SUZUKI, ISAMU MURATA, YUTAKA INOUE, KENJI KOBATA, IKUO KANAMOTO (Josai Univ.)

【目的】
我が国において大豆は、豆腐、味噌、納豆など日本人の食生活には欠かせない食品用に加工されている。大豆には大豆イソフラボンが含まれており、大豆イソフラボンは化学構造がエストロゲンと類似していることから女性ホルモン様作用をもつとされている。現在、大豆イソフラボンは医療用医薬品や機能性食品などに用いられている。大豆イソフラボンには Daidzein(DDZ)、Genistein、Glycitein があり、そのうち DDZ は最も作用が弱いため身体への影響が少なく、安全であることから我々は DDZ に着目した。環状多糖類である γ-Cyclodextrin(γ-CD)はゲスト分子を空洞内に包接することで、ゲスト分子の溶解性改善や安定化が報告されている。そこで、本研究では DDZ の利用拡大を目指し、DDZ/γ-CD 複合体を調製し、物理化学的性質及び溶解性について評価を行った。
【方法】
試料の調製は DDZ と γ-CD をモル比 1/1 で秤量後、物理的混合物(PM)、3 次元ボールミルで 60 分間共粉砕した混合粉砕物(3DGM)、混錬物(KD)を調製した。溶解度相図を Higuchi と Connors の方法に従って作成し、包接複合体のモル比について確認した。調製した試料について、示差走査熱(DSC)測定、粉末 X 線回折(PXRD)測定、^{1}H-^{1}H NOESY NMR(D_2O)測定及び溶出試験を行い、複合体の物理化学的特性について評価した。
【結果及び考察】
溶解度相図の結果、DDZ と γ-CD はモル比 1/1 で包接されていることが推察された。DSC 測定の結果、DDZ は 337°C 付近に吸熱ピークが観察されたが、3DGM、KD では観察されなかった。PXRD 測定の結果、PM 及び DDZ において特徴的な結晶回折ピーク(2θ=10.2°、24.4°)が観察され、3DGM、KD において DDZ の特徴的な結晶回折ピークは観察されず、γ-CD の包接複合体に特徴的な結晶回折ピーク(2θ=12°)が観察された。このことから、DDZ/γ-CD=1/1 の複合体形成が示唆された。
^{1}H-^{1}H NOESY NMR(D_2O)測定の結果、3DGM、KD では DDZ のフラバン骨格の脂溶性部位であるベンゼンと γ-CD の内腔のプロトンにおいてクロスピークが観察された。したがって包接様式としては 2 つのパターンがあると推察された。溶出試験の結果、試験開始後 15 分での 3DGM、KD の溶解性は DDZ と比較し約 25 倍向上した。以上のことから、DDZ の溶解性向上は DDZ と γ-CD との包接複合体形成が寄与しているものと考えられた。

Daidzein, γCyclodextrin, cogrinding

講演番号：2B10p12
講演日時：3 月 16 日 16:21～ 共通講義棟南 B10 会場

豆腐の処方がテクスチャーに及ぼす影響　～生体計測による摂食嚥下特性の評価～
Influence of recipe of tofu to the texture ~Evaluation of ingesting/swallowing properties using bioinstrumentation~

○加藤 元裕[1]、櫻井 英樹[1]、西垣 壽人[1]、池田 三知男[1]、堀 一浩[2]、小野 高裕[2]([1]森永乳業・研究本部、[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科)
○Motohiro Kato[1], Hideki Sakurai[1], Hisato Nishigaki[1], Michio Ikeda[1], Kazuhiro Hori[2], Takahiro Ono[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co., LTD・R&D Division, [2]Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

【目的】
豆腐は日本人の食生活に深く根ざしており、栄養豊富な上に、そのテクスチャーから健常者だけでなく摂食嚥下機能の低下した人にとっても適性の高い食品であると考えられる。これまで豆腐製品を「えん下困難者用食品たる表示の許可基準」で評価した研究は少なく、実際の摂食嚥下特性についても十分な数の研究は行われていない。本研究では、処方が異なる複数の豆腐製品について、温度帯別の機器計測および生体計測を実施し、豆腐の処方がテクスチャーに与える影響を考察し、各種豆腐の摂食嚥下特性を評価することを目的とした。
【方法】
処方の異なる豆腐（６種）に対し、機器計測は「えん下困難者用食品たる表示の許可基準」に従って実施した。生体計測は健常有歯顎者４名を被験者とし、摂食嚥下時の舌骨上筋群の「筋電位」測定（皮膚表面に電極を貼って測定)、「舌圧」測定（口蓋部に舌圧センサーシートを貼付けて測定)、および嚥下時の「嚥下音」測定（咽喉マイクを装着して測定）を実施した。試料はそれぞれ１０ｇとし、温度を１０℃および４５℃に調整し試験に供した。「筋電位」、「舌圧」測定時は歯を使わず舌で押しつぶして嚥下するよう指示した。「嚥下音」測定時は１回で嚥下するように指示した。
【結果・考察】
機器計測で得られた結果より、測定した豆腐製品はえん下困難者用食品たる許可基準のⅠ～Ⅲ、基準外に分かれており、大豆蛋白質を配合したものは、それを配合しない豆腐より硬さ、付着性が高かった。生体計測では、大豆蛋白質を配合したものは、筋電位測定で得られる舌骨上筋群活動量や、舌圧測定によって得られる舌活動量が通常の豆腐よりも高かった。嚥下音測定で得られる食塊の流動音継続時間は、大豆蛋白質に加え栄養強化目的で油脂や食物繊維を配合した高栄養製品が一番短かった。食塊の流動音継続時間は、短いほど咽頭で食塊が纏りやすいことが知られており、この製品が嚥下機能の低下した人に適した性質を持つことが示唆された。測定温度１０℃と４５℃の結果を比較すると、機器計測では４５℃の付着性が１０℃の結果よりも低かった。生体計測では、食塊の流動音継続時間と舌骨上筋群活動量は、２温度帯で顕著な差は見られなかったが、舌活動量は、特に大豆蛋白質を配合した製品で４５℃の方が高い傾向があった。豆腐は加熱調理して供されることも多いが、温度変化による摂食嚥下特性も明らかにすることができた。

tofu, texture, dysphagia

発表責任者：加藤　元裕（m-katou@morinagamilk.co.jp）

講演番号：2B10p13
講演日時：3 月 16 日 16:32～ 共通講義棟南 B10 会場

米菓咀嚼中の食塊物性の変化が口どけ感に及ぼす影響

The effects of changes in physical properties of bolus during chewing rice crackers on kuchidoke feelings

○細井 友加里[1]、山谷 健太[2]、竹井 亮[2]、丸山 健太郎[2]、勝野 那嘉子[3]、西津 貴久[3]([1]岐阜大院、[2]亀田製菓株式会社、[3]岐阜大)
○Yukari HOSOI[1], Kenta YAMAYA[2], Ryo TAKEI[2], Kentaro MARUYAMA[2], Nakako KATSUNO[3], Takahisa NISHIZU[3] ([1]Grad. Sch. of Natl. Sci.&Tech, Gifu Univ., [2]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [3]Gifu Univ.)

【目的】食品の口どけ感はおいしさに関わる重要な因子の一つである. チョコレートのような油脂性食品では油脂含量や融点が口どけ感に関与するという報告がある. 一方, 米菓の口どけ感に関する報告はほとんどなく, その支配因子は未だ明らかになっていない. 当研究室のこれまでの研究から, 咀嚼中に唾液酵素によって澱粉が分解して食塊粘度が減少するとともに, 食塊中の固形粒子の粒径が減少することを明らかにした [1)]. 本研究では米菓の特性と口どけ感の関係について考察することを目的として, 米菓の食塊の唾液吸収量, 食塊中の固形粒子の粒径, 澱粉の平均重合度の経時変化を測定し, 食塊物性と酵素反応による澱粉の分解が口どけ感に及ぼす影響を検討した.
【方法】試料は, うるち米, もち米を主原料とした米菓, 澱粉を混合した米菓から 5 品種を選択し, 口どけ感の評価を既報の順位法 [2)]により行った. 官能評価に際して, あらかじめ米菓の唾液吸収量の繰り返し測定を行い, 吸収量がほぼ同じで再現性の高い 5 名のパネル(20～23 歳, 男性 2 名, 女性 3 名)を選抜した. 唾液吸収量の測定には, パネルが 70 回/min の速さで 5, 10, 20, 30 秒間咀嚼してできた食塊を供した. 食塊中の固形粒子の粒度分布は篩分析法で測定した. 食塊を 99.5 %エタノールに 20 分間浸漬して脱水し, 目開きが 11 段階の篩（20 μm～1700 μm）で篩別後, 45 ℃下で 90 分間乾燥し, 篩上の質量を測定した. また同様に咀嚼した食塊を, 37 ℃の水 35 ml に分散するとともに, 直ちに 12 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を添加して唾液中の酵素を失活させた後, 70 ℃の温浴中で 5 分間ホモジナイズした. 得られた試料の還元糖量と全糖量から澱粉の平均重合度の経時変化を求めた.
【結果】唾液吸収量はすべての試料で増加し, 咀嚼時間が 10 秒以上になると, 口どけ感の良い米菓ほど唾液吸収量は大きくなった. 平均粒径は, 咀嚼時間が 5 秒では違いが見られないが, それ以降は咀嚼時間が長くなるほど減少し, 口どけ感の良い米菓ほど粒径の減少速度は大きくなった. 澱粉の平均重合度は, 咀嚼の進行とともにすべての試料で減少したが, その減少速度は試料によって異なり, 澱粉が混合された米菓やもち米の米菓の重合度減少速度は, うるち米の米菓よりも大きくなった. 酵素反応は, 食塊粒径に試料間差のない咀嚼初期においても進行し, 試料により澱粉の重合度が異なることから, 酵素による澱粉の重合度の変化には, 米菓の材料特性の違いが影響していると考えられる.

1）細井友加里ら, 日本食品科学工学会第 64 回大会　講演要旨集
2）細井友加里ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会　講演要旨集

rice crackers, melt-in-mouth, chewing

講演番号：2B10p14
講演日時：3 月 16 日 16:43～ 共通講義棟南 B10 会場

プロテアーゼ処理した米タンパク質を添加したグルテンフリー米粉バッターの動的粘弾性について
Dynamic viscoelasticity of protease-treated rice batters for gluten-free rice bread making

○井上 七海、有側 紗愛、本多 裕司（石川県大・生資環）
○Nanami INOUE, Sae ARIKAWA, Yuji HONDA (Ihsikawa.Pref.Univ.)

【目的】

通常、パンを製造する際には、小麦粉を用いて製造されている。小麦には貯蔵タンパク質としてグリアジンとグルテニンが含まれている。小麦粉に水を添加して混捏すると、両タンパク質が SS 結合を介して重合化し、粘弾性に富むグルテンを形成する。このグルテンはドウの発酵過程において酵母から発生する炭酸ガスを保持する役割があるとともに、パンを焼成する際の「屋台骨」の役割を担う重要なタンパク質である。

一方、グルテンは「小麦アレルギー」や欧米で多くみられる「セリアック病」などの原因となるタンパク質である。現在、これらの根本的な治療法は確立されていないので、これらの患者の方はグルテンを除去した食事を摂取することが強いられている。一方、グルテンを含まない米粉で作ったパンであれば、これらの患者の方もパンを食することができる。ところが、グルテンを含まない米粉を用いてパンを焼成すると、大きく膨らまないので、品質の良いグルテンフリー米粉パンを焼成するにはグルテン形成とは異なる工夫が必要である。

我々は、プロテアーゼを添加してグルテンフリー米粉パンを焼成すると、比容積が増大する事を報告した [1)]。プロテアーゼを添加したグルテンフリー米粉パンの比容積が増大した要因として、米タンパク質の分解によって米粉のレオロジー特性が大きく変化したことが考えられた。本研究では、プロテアーゼ処理した米タンパク質を分離して、米タンパク質が米粉バッターのレオロジー特性に与える影響を調べることを目的とした。

【方法および結果】

米粉（福盛シトギ２号）にプロテアーゼを作用させた後に、様々な溶媒（水、アルカリ、食塩水およびエタノール）を用いてタンパク質を分画した。また、プロテアーゼ処理をしていない米タンパク質も上記溶媒を用いて抽出した（コントロール）。各抽出タンパク質を脱塩および濃縮した後に、凍結乾燥した。凍結乾燥した各タンパク質（0.05 g）を米澱粉 3.95 g に添加して、蒸留水 4 mL と混捏した。混捏した試料を動的粘弾性測定装置（MX-1000、（有限会社サンズコーポレーション））を用いて、35℃における貯蔵弾性率と損失弾性率を測定した。

各抽出タンパク質を添加した米澱粉の動的粘弾性のパラメーターを比較してみると、エタノール抽出画分を添加した試料に顕著な差がみられた。現在、抽出したタンパク質の組成について分析を試みているところである。

[1)] E.Hatta, K.Matsumoto, Y.Honda: Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread. Journal of Cereal Science Vol.61, pp.41-47 (2015).

dynamic viscoelasticity, gluten free, rice bread

発表責任者：本多裕司（honda@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2B10p15
講演日時：3 月 16 日 16:54～ 共通講義棟南 B10 会場

高硬度ゲル形成乾燥卵白におけるタンパク質分子間の結合の様相について

Modality of protein intermolecular bond in high-hardness gel formation dried egg white

○根本 裕子[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[3]、江崎 智弘[4]、児玉 里紗[4]、半田 明弘[4]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学、[4]キユーピー（株）研究開発本部)

○Yuko NEMOTO[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[3], Tomohiro EZAKI[4], Risa KODAMA[4], Akihiro HANDA[4], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]FPC,Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [4]R&D Div., Kewpie Corp.)

【目的】

卵白は畜肉加工品や魚肉練り製品、洋菓子や麺類など幅広い食品に物性改良材として利用されている。乾燥卵白は液卵白に比べ硬く弾力性に富むゲルを形成することから、中華麺や畜肉加工品を中心に広く使用されている。本研究はこの乾燥卵白のゲル形成メカニズムを解析することを目的としており、これまでにゲル強度が高い乾燥卵白ではタンパク質の高分子量化が確認され、同分子量とゲル強度に正の相関があることを報告した。しかし、卵白高分子量体がどのような結合状態で存在しているのかは不明である。そこで今回は、ゲル強度と各結合との関係性について検討した。

【方法】

乾燥卵白はゲル強度の異なる 6 種類（キユーピー）を用いた。卵白ゲルは試料を 12.5%（w/v)になるよう水に加え、80℃、40 分間保持し冷却後、圧縮型物性測定器（インストロン社製）を用いて破断時の圧縮応力と圧縮ひずみを測定した。試料のタンパク質組成および凝集体の存在比を Blue Native-PAGE および SDS-PAGE にて確認した。遊離の SH 基量は Ellman 法にて求め、さらに試料を 6M HCl にて加水分解し Agilent Technologies 社製 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS に供し、ランチオニンおよびリジノアラニンを測定した。

【結果】

Blue Native-PAGE の結果、ゲル強度が高い試料では卵白にはみられない 242～1236kDa の高分子量の広域にバンドが観察されると共に一部はウェルに残存する卵白タンパク質の高分子量体の存在を確認した。そこで、高分子量体が観察された試料を 2-メルカプトエタノール(2-Me)にて還元し 2D-PAGE（Blue Native-PAGE/SDS-PAGE)に供した結果、同バンドの分子量に変化はみられなかった。NaCl、尿素、SDS（±2-Me）の各溶液にて処理したところ、試料によって低分子量域のタンパク質バンドの濃淡に多少の差はみられたが、何れの場合でも高分子量領域のバンドが残存していた。ゲル強度が高い試料すなわち高分子量のバンドが濃い試料ほど遊離 SH 基量が少なく、ランチオニンおよびリジノアラニンの量が増加した。

physical properties measurement, electrophoresis, LC/MS

発表責任者：根本裕子（y.nemoto.nodai@gmail.com）

講演番号：2B10p16
講演日時：3 月 16 日 17:15～ 共通講義棟南 B10 会場

人工知能は食感を予測できるか？　－麺内部の３次元ミクロ構造からの食感の予測－

Can artificial intelligence predict food texture? -Prediction of food texture from three-dimensional micro-structure inside noodle-

○小川 剛伸、谷 史人（京大院農）
○Takenobu OGAWA, Fumito TANI (Kyoto Univ.)

【概要】麺などの食感は、内部のグルテンや澱粉から成るミクロ構造で決まるが、構造の複雑性および不均一性ゆえに、食品内部の構造から食感の予測はできなかった。演者らは、人工知能の活用に着目したが、人工知能に学習させるデータの量的不足が最大の課題となっていた。そこで、演者らが発見した新規物質による麺などの食品の透明化技術を活かすことで、従来の機械的セクショニングに替わり、光学的セクショニングによる３次元ミクロ構造の高速な画像計測を可能にし、データの多量化および取得時間の短縮化を実現した。これにより、食品内部の構造から食感を予測する道を拓くことに成功した。また、人工知能の学習内容を解析することで、これまで推察の域を出ていなかった「食感を生み出す食品内部の特徴的な構造」を特定できることを明らかにした。

【背景】工業的に製造される多くの食品は、経験に基づき、試行錯誤的に開発されている。食感と構造との関係については多くの研究がなされてきたが、構造から食感を予測するに至っていない。
【課題および解決方策】近年、人工知能の発達が目覚ましく、畳み込みニューラルネットワーク（CNN）により、例えば、画像に写った対象物を高精度に判別（予測）でき、さらに、他データで学習済みの CNN に新データを学習（転移学習）させることにより、学習に要するデータ量を大幅に低減できるようになった。しかし、高精度な予測には、尚も数千枚の画像データが不可欠であり、数千の試料切片から２次元画像データを取得することは現実的に困難であった。そこで、従来の２次元画像計測から３次元画像計測に拡張化することによりデータ量を増大させるという着想のもと、演者らが開発した食品の透明化溶液を用いた３次元ミクロ構造計測法を活用することで、また、透明な試料に対し威力を発揮するライトシート顕微鏡を用い、２次元画像 1000 枚分に相当する一つの３次元画像データを数分間で取得することで、データの多量化と取得時間の短縮化を図った。
【結果および考察】内部の構造が異なる数種の麺に対する、３次元ミクロ構造データとレオメータで計測した食感としての破断強度とを人工知能に転移学習させた。各麺について異なる場所で計測した３次元ミクロ構造データとそれに対応する破断強度を用いて予測精度を検証した結果、95%以上の精度で破断強度を予測できた。これにより、人工知能に未知の麺内部の構造データを与え、破断強度を予測する道が拓けた。また、学習後の CNN を解析することで、長年の謎であった「食感を生み出す食品内部の特徴的な構造」を特定できることを示した。本成果は、食感などの品質を自在にデザインするための学術的な基盤の確立につながることが期待できる。

artificial intelligence (AI), food texture, three-dimensional micro-structure

発表責任者：小川剛伸（ogawat@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B10p17
講演日時：3 月 16 日 17:26～ 共通講義棟南 B10 会場

ゲル状食品のレオロジー解析によるテクスチャー評価
Texture evaluation by rheological analysis of gelled foods
○鬼島 直子[1]、砂押 諒[2]、石川 大太郎[2]、藤井 智幸[2] ([1]東北大未来研、[2]東北大院農)
○Naoko KIJIMA[1], Ryo SUNAOSHI[2], Daitaro ISHIKAWA[2], Tomoyuki FUJII[2] ([1]Tohoku Univ, [2]Tohoku)

【目的】ゲル状食品の食感評価においては、その種類によってあるいは特徴的な物理的特性に応じて様々な方法が選択されている。換言すれば、統一的な評価法が確立しているわけではなく、一長一短な方法が乱立しているというのが現状である。そこで、本研究ではゲル状食品をゴム弾性体として捉えた評価法に着目し、テクスチャー評価の標準化の可能性について検討を行った。
【方法】市販の８種類のゲル状食品（魚肉タンパクゲル、卵タンパクゲル、大豆タンパクゲル、マンナンゲル、デンプンゲル、ゼラチンゲル、寒天ゲル）を選び、10 ㎜角の立方体に成形し、25℃でクリープメーター（株式会社山電 RE2-3305S）を用いた圧縮試験に供した。圧縮試験は、接触面が 10×10 ㎜（10 ㎟）のプランジャーを用いた弾性測定、楔形プランジャーを用いた破断測定、直径 1 ㎜のプランジャーを用いた貫入測定の３種類の測定を行った。圧縮速度は 0.1 ㎜/ s とした。弾性測定によって得られた応力－ひずみ曲線を理想ゴムモデルを大変形領域まで拡張した BST 式：

$$\sigma = -\frac{2E}{3n}\left(\lambda^{n} - \frac{1}{\lambda^{2n}}\right)$$

を用いて解析した。ここで、σ は圧縮応力、λ は圧縮比（L/L_0）、E は圧縮時のゴムのヤング率、ｎは非理想性指数、L_0 は試料の初期長さ、L は圧縮された試料の長さ（圧縮の場合λ＜１となる）である。
【結果】実験に供したゲル状食品のうち、圧縮測定において、フックの法則が適応できない非線形の応力-ひずみ曲線が得られた６種の食品について、BST 式の適用を試みたところ、ひずみが 0.35 までの範囲において BST 式で良好に記述することができた。BST 式の適用範囲は食品によって異なっていた。圧縮測定によって得られたｎ、E、破断応力 σ_r、貫入破断応力 σ_p を比較すると、σ_r が 1.2×10^4～4.8×10^4 Pa と同程度であった寒天ゲル、ゼラチンゲル、デンプンゲル、大豆タンパクゲルに関して、ゴムのヤング率Ｅは 6.3×10^2～3.8×10^3 Pa の範囲に、σ_p は 2.5×10^3～3.0×10^4 Pa の範囲に分布した。非理想性指数 n は 1.03～7.39 の範囲に分布し、理想ゴム弾性体の場合ｎ＝１となることから、理想ゴム状態との隔たりを定量的に表すことが可能であることが示され、ゲル状食品の食感特性評価の新たな指標として用いることができると考えられた。ｎとＥを二次元プロットにマッピングすると、ゲル状食品の種類によってプロットされる位置が異なり、テクスチャー評価に応用可能であることが示された。以上の結果から、圧縮試験において、プランジャーを変えることによって、弾性・破断・貫入の特性を分離して評価することができた。

gel food, texture

発表責任者：鬼島直子（naoko.kijima.d4@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B10p18
講演日時：3 月 16 日 17:37～ 共通講義棟南 B10 会場

食品の違いが嚥下筋活動時間に与える影響

Effect of muscle activity time during swallowing due to food differences

○中川 晴貴[1]、澤野 友貴[1]、渡辺 誠一[1]、小木曽 加奈[2]、大森 信行[3]、百瀬 英哉[4]（[1]長野高専、[2]長野県短大、[3]長野県工技センター、[4]スキノス NAGANO）
○Haruki NAKAGAWA[1], Tomoki SAWANO[1], Seiichi WATANABE[1], Kana KOGISO[2], Nobuyuki OHMORI[3], Hideya MOMOSE[4] ([1]National Institute of Technology, Nagano College, [2]Nagano Prefectural College, [3]Nagano Prefecture General Industrial Technology Center, [4]Skinos Nagano Co., Ltd.)

嚥下とは、できあがった食塊や液体を咽頭・食道を経て胃に送り込む運動を言い、食塊の位置に基づいて、咀嚼後の食塊を咽頭に向けて移送する口腔期、咽頭から食道まで食塊を移送する咽頭期、食道に入った食塊を胃に移送する食道期からなる。筆者らは、とろみ調整食品を利用して嚥下した際の筋電計による嚥下筋活動の測定結果から、嚥下障害の度合いや、とろみ調整食品の粘度に対する適合性について把握するための基礎研究に取り組んできた。また、人の食嗜好と嚥下筋活動との関係性を明らかにするためにクエン酸を嚥下した場合の嚥下筋活動の測定を試みてきた。嚥下筋活動の測定結果を利用して、将来的においしさを感じられる食品開発に活かすことができるのではと考えている。

嚥下の状況を測定する方法として X 線を用いた嚥下造影検査があるが、装置が大掛かりであり、検査する際に被験者が放射線被曝する問題があることから、筆者らは、粘着シート状に複数の筋電図電極を取り付けたセンサシートを開発して、安全かつ簡便に嚥下筋活動を測定する方法を確立した。

本講演では、センサシートを用いて嚥下筋活動の変化量が大きく異なると予想される食品 14 種類を嚥下した場合の筋電図波形における嚥下筋活動時間の測定結果について述べる。実験に用いた食品は、プリン、食パン、モツ煮、こんにゃく、あさり、焼き芋、トマト、かまぼこ、そば、餅、りんご、キャベツ、酢だこ、メンマである。筋電位を測定した嚥下筋群はオトガイ舌骨筋付近、甲状舌骨筋付近、胸骨舌骨筋付近、胸骨甲状筋付近の計 4 箇所である。また、嚥下実験における被験者数は 20 代女性 9 名、40 代女性 1 名で、食品 1 つについて 2 回ずつ測定した。その結果、嚥下筋活動時間が短い傾向にある食品はりんご、トマト、あさり、モツ煮など、比較的柔らかい食品であることがわかった。また、食品の好き嫌いで嚥下筋活動時間に変化が生じるのかを調査するために、トマトの好き嫌いについて被験者に調査を行った上で嚥下筋活動時間の測定を行った結果、トマトが嫌いと回答した被験者の方が嚥下筋活動時間が長くなる傾向がみられたが、有意水準 5%の t 検定では有意な差はみられなかった。

Swallowing, Electromyography, Sensor sheet

発表責任者：渡辺誠一（watanabe@nagano-nct.ac.jp）

講演番号：2B10p19
講演日時：3 月 16 日 17:48～ 共通講義棟南 B10 会場

通電処理によるシカ肉の嗜好性

Palatability of the deer meat by use of electrical energy

○小木曽 加奈[1]、川口 友万[2]、中川 晴貴[5]、大森 信行[3]、百瀬 英哉[4]、渡辺 誠一[5]、澤野 友貴[5]、古田 一匡[6]、坂田 亮一[7]（[1]長野県短大、[2]科学実験酒場、[3]長野県工業技術総合センター材料技術部門、[4]株式会社スキノス NAGANO、[5]長野高専、[6]富士通株式会社、[7]麻布大獣医）

○Kana KOGISO[1], Tomokazu KAWAGUCHI[2], Haruki NAKAGAWA[5], Nobuyuki OOMORI[3], Hideya MOMOSE[4], Seiichi WATANABE[5], Tomoki SAWANO[5], Kazumasa FURUTA[6], Ryoichi SAKATA[7] ([1]Nagano Pref. Col., [2]Scientific Experiment Bar, [3]NPGIT Cent., [4]Skinos Nagano Co., Ltd., [5]National Institute of Technology Nagano Col., [6]Fujitsu Limited, [7]Azabu Univ.)

【目的】

近年、日本における鳥獣被害が深刻な状況にある。シカを食糧資源として利用を比較的推進している長野県でも 4.5%程度にとどまり、まだまだ活用の動きは鈍い。そのため利用者が美味しく食べられる方法を確立することによって、市場や利用者も拡大していくのではないかと考えられる。ところでシカ肉は他の肉に比べ、硬く匂いが独特であるという弱点を有する。今回はシカ肉をより一層おいしく食肉加工するための方法として通電処理を行い、嗜好性における変化について検討を行ったので報告する。

【方法】

シカ肉（背ロース）は長野県内で採取されたものを-80℃で保存し、使用前に冷蔵庫内で解凍して使用した。このシカ肉の肉塊を半分に切り、通電処理を行うことで試料とした。残りの半分の肉塊を比較対象とした。それらを 2 ㎝×3cm×1cm にスライスしたのち、同時にホットプレートで加熱後、味をつけず官能試験を行った。官能試験については以下のように行った。被験者は健康で味覚に問題のない大学生および教員 11 名（女性 11 名、年齢 19-41 歳）を選抜した。アンケート用語項目は肉の臭み（弱い 1→強い 5)、肉のうま味（弱い 1→強い 5)、肉の硬さ（硬い 1→軟らかい 5)、肉のおいしさ（まずい 1→おいしい 5）とし非通電処理のものと二点比較を行った。

通電処理の方法として電力調整器を主部品とした自作装置を用いた。通電処理は 1 分間とし、電力調整器で調整を行った。また電圧は家庭電圧で一般的な 100V とした。電圧と電流は検電器を用いて測定を行った。

【結果・考察】

シカ肉への通電時、電流は平均 0.66 A、電圧は平均 102.6 V であった。官能試験の結果、通電処理後の肉は通電しないものに比べ、肉の臭みは有意に弱くなる(p<0.0001)ほか、肉の硬さも有意に軟らかく(p=0.0016)、おいしく(p=0.0117)なった。以上のことから、今回の通電処理では短い時間でシカ肉の弱点である臭みと硬さを抑えることができた。

なお、本研究は科研費（17K00841）の助成を受けたものである。

Deer, Palatability, Electrical energy

発表責任者：小木曽加奈（kf-kana@nagano-kentan.ac.jp）

講演番号：3A01a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A01 会場

レシチンの給与が乳牛ルーメン発酵、乳生産に与える影響

Effect of lecithin feeding on rumen fermentation and milk production of dairy cattle

○雑賀 あずさ[1]、泉 賢一[2]、岸野 重信[1]、井上 亮[3]、木村 功[4]、斎藤 三四郎[4]、小川 順[1]([1]京大院農、[2]酪農大、[3]京府大生環、[4]（株）J-オイルミルズ)
○Azusa SAIKA[1], Kenichi IZUMI[2], Shigenobu KISHINO[1], Ryo INOUE[3], Ko KIMURA[4], Sanshiro SAITO[4], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Rakuno Gakuen Univ., [3]Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., [4]J-OIL MILLS, Inc.)

【背景・目的】

脂質は高エネルギー栄養素であり、重要なエネルギー供給源となる一方で、反芻動物への脂質の過給は、ルーメン発酵に影響を与え、飼料消化率や揮発性脂肪酸（VFA）生産量の低下をもたらすことが知られている。VFA は、反芻動物のエネルギー源として利用されるのみならず、乳牛では乳糖や乳脂肪の合成原料としても利用される。そのため、高泌乳時や暑熱ストレスによる採食量低下時などには、ルーメン発酵に影響の少ないルーメンバイパス油脂である脂肪酸カルシウム（Ca）や飽和脂肪酸がエネルギー給与源として用いられている。しかしこれらは、嗜好性が低いことが課題になっている。演者らは、反芻動物に適用可能な脂質系飼料原料の探索を行い、リン脂質を主成分とするレシチンが、ルーメン発酵を促進し、VFA 産生量を増加させる機能を有することを見いだした。そこで本試験では、泌乳牛群を用いて、大豆由来レシチンのルーメン発酵性、乳生産性に与える効果を、脂質系飼料である脂肪酸 Ca の効果と比較し、レシチンの有用性を検討した。

【方法】

ホルスタイン種泌乳牛 11 頭を産次、乳量、乳脂肪率が等しくなるように、無添加区 4 頭、レシチン区 4 頭、脂肪酸 Ca 区 3 頭に分け、試験に用いた。予備期 1 週間、投与期 1 週間の大豆レシチン、脂肪酸 Ca の給与試験を行い、1 週間の平均乳量および各期終了日の乳成分、ルーメン液における VFA 産生の評価を行った。

【結果】

1 週間の給与により、レシチン区および脂肪酸 Ca 区では乳量が増加する傾向を示した。予備期から投与期にかけての乳量の増加量は、脂肪酸 Ca 区と比べ、レシチン区で高かった。さらに、レシチン区では、乳量の増加に伴い、乳糖、乳蛋白質も増加した。一方、脂肪酸 Ca 区においては、乳成分は増加しなかった。また、レシチン区ではルーメン液中の酢酸、プロピオン酸濃度の増加傾向、およびアンモニア態窒素濃度の減少が観察された。このことから、レシチンにはルーメン発酵を促進させ、ルーメン内 VFA 量を増加させる効果があり、その結果乳成分と乳生産量を増加させることが示された。今後、乳生産向上効果を有する脂質系飼料原料としてのレシチンの利用が期待できる。

Lecithin, volatile fatty acids, rumen fermentation

講演番号：3A01a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A01 会場

ミツバチ腸内細菌の遺伝子改変技術の開発
Genetic modification of honey bee gut bacteria
○福田 洸平[1]、新谷 政己[1]、宮崎 亮[2] ([1]静大創造、[2]産総研)
○Kohei FUKUDA[1], Masaki SHINTANI[1], Ryo MIYAZAKI[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]AIST)

【目的】セイヨウミツバチの腸内細菌叢は 8 種類の優占種によって安定的に構成されており、これらの優占種は実験室環境下にて単離培養が可能である。これまでに、単離株のゲノム情報より、ミツバチの腸内細菌間で遺伝子の水平伝播が起きていることが示唆されているものの、その実態は実験的に証明されていない。我々は遺伝子の水平伝播が細菌コミュニティに対して与える影響を明らかにすることを目的として研究を行っている。本研究では、その第一段階として腸内環境中での遺伝子の水平伝播現象を 1 細胞レベルで網羅的に検出・可視化するために、ミツバチ腸内細菌で使用可能な蛍光タンパク質の検討、およびそれら細菌種の変異株ライブラリーの作製を行った。
【手法】セイヨウミツバチの腸より単離された 3 種の優占プロテオバクテリア *Frischella perrara*, *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi* を用いて実験を行った。広宿主域ベクターである pME6032, pBBR1MCS, pHRP308 に mCherry もしくは GFP 遺伝子をクローニングしたプラスミドを作製し、エレクトロポレーションにて菌体に導入した。得られたプラスミド保持株を蛍光顕微鏡で観察し、蛍光タンパク質による腸内細菌種の可視化が可能か検討した。変異株ライブラリーの作製には、Himar1 系トランスポゾンベクターpSC189 および pBT20 を使用した。各ベクターを保持するジアミノピメリン酸要求性大腸菌を供与菌、ミツバチ腸内細菌を受容菌とし、プレート上で接合伝達を行うことによってトランスポゾンが受容菌ゲノムにランダムに挿入された変異体の取得を試みた。得られた変異体コロニーのカウント、および変異体 DNA を用いた PCR やシーケンスによって、変異体出現頻度やトランスポゾンの挿入位置を調べた。
【結果】*F. perrara*, *G. apicola* は pHRP308 を、*S. alvi* は pBBR1-MCS および pHRP308 を保持可能であることが明らかとなった。また、*S. alvi*, *G. apicola* で GFP の発現が、*S. alvi* で mCherry の発現が確認できた。現在、複数種のミツバチ腸内細菌で安定的に発現可能な GFP と mCherry を開発するためにコドン使用頻度の最適化を行っている。変異株ライブラリーの作製については、pBT20 ベクターを用いたランダム変異導入により、*F. parrara*, *S. alvi* の変異株をそれぞれ 10^{-5}, 10^{-3}mutant cell/donor cell の頻度で得ることに成功した。しかし、得られた変異株のうち *F. perrara* では 4/10、*S. alvi* では 1/10 でベクターの co-integrate が確認されたため、現在、各細菌種におけるトランスポゾン挿入効率の最適化を試みている。

honey bee gut microbes, genetic modification, mutagenesis

講演番号：3A01a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A01 会場

遅発育性病原菌の迅速薬剤感受性試験法の開発

Development of rapid susceptibility testing for slowly growing pathogens

○塚谷 忠之[1]、末永 光[1]、池上 天[2]([1]福岡県工技セ・生物食品研、[2]同仁化学研究所)
○ Tadayuki TSUKATANI[1], Hikaru SUENAGA[1], Takashi IKEGAMI[2] ([1]Fukuoka Industrial Technology Center, [2]Dojindo Laboratories)

【目的】
非結核性抗酸菌による感染症は近年増加の傾向にあり、公衆衛生上、重要な感染症となりつつある。非結核性抗酸菌は代表的な遅発育性病原菌の 1 つであり、その薬剤感受性試験には数週間程度の時間を要することが問題となっている。そこで、非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験の迅速化を目的として、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法の適用を試みた。
【方法】
(1)検出試薬：水溶性テトラゾリウム塩（WST-1、XTT）と電子メディエータ（キノン、フェナジン化合物）を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。
・WST法：WST-1(10mM)及び2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzoquinone (0.8mM)
・XTT法1：XTT(10mM)及び2-methyl-1,4-naphthoquinone (0.8mM)
・XTT法2：XTT(10mM)及びphenazine methosulfate (0.8mM)
(2)増殖アッセイ：96ウェルマイクロプレートにMiddlebrook 7H9 broth（10% ADC enrichment、0.2%グリセロール含有）により調製した10倍希釈系列密度の微生物懸濁溶液190μLを分注し、これに検出試薬10μLを添加して37℃で440nm(WST-1)あるいは470nm(XTT)における吸光度を経時的に測定した。
(3) 最小発育阻止濃度(MIC)測定：96ウェルマイクロプレートにMiddlebrook 7H9 brothにより調製した２倍希釈系列濃度の抗生物質溶液95μLを分注し、これに微生物懸濁溶液95μLを加え、さらに検出試薬10μLを添加して37℃で一定時間インキュベーションした。経時的に吸光度測定を測定し、コントロール（抗生物質無添加）の吸光度が0.5以上に達した際に、ブランクと比較した吸光度変化が0.1以上のウェルを生育、以下を阻止と判定し、MIC値を測定した。
【結果】
WST 法を用いた *Mycobacterium kansasii* 及び *M. avium* の増殖アッセイ試験では、微生物密度、培養時間、吸光度変化に良好な比例関係が認められ、定量的な測定が可能であった。一方、XTT 法では著しいバックグラウンドの上昇が見られ、定量的な測定ができなった。さらに、*M. kansasii* 及び *M. avium* の臨床分離株と代表的な抗生物質を用いて MIC 値を測定したところ、WST 法（3 日間）により得られた MIC 値は、標準法（目視判定法、7～14 日間）により得られた MIC 値と良好に一致した。これらの結果から、従来法と比較して、増殖アッセイや薬剤感受性試験において WST 法の有用性が示された。

slowly growing pathogen, susceptibility testing, tetrazolium salt

講演番号：3A01a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A01 会場

エマルションドロップレットを用いた微生物培養

Culture of micro-organisms by emulsion droplet

○村井 雄大、森田 直樹、土居 克実、久原 哲、田代 康介、牟田 滋（九州大　院農）
○Yuta MURAI, Naoki MORITA, Katsumi DOI, Satoru KUHURA, Kousuke TASHIRO, Shigeru MUTA (Fac. Agri, Kyushu Univ.)

【緒言】

環境中には膨大な量と種の微生物が存在しており、そのうち単離、培養ができる微生物は 1%未満といわれている。難培養である原因として、生育の早い他の微生物による淘汰や環境中の未知の生育因子への依存等が考えられる。本研究では、エマルションドロップレットという微小空間で様々な環境微生物を培養する手法を検討した。微小空間に分画された微生物はその隔離効果によって、他の微生物と競合しない生育が期待できる。また、少量の環境試料を数百万のサンプルが得られることから、成分組成をそのままに、環境再現度の高い培養が可能であるため、未知生育因子に依存する微生物の生育も期待できる。難培養性微生物の発見と単離・培養することが本研究の最終的な目標である。

【実験】

ドロップレットジェネレータを用いて、直径 40-50 μm のエマルションドロップレットを生成し、封入する溶液や培養方法などの最適条件を検討した。続いて、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Lactobacillus rapi*、*Pediococcus lolii* をそれぞれドロップレットで封入、培養し、増殖等評価した。最後に、土壌サンプルの抽出液を作成し、ドロップレットに封入・培養後、増殖等評価した。

【結果及び考察】

2×YT 培地、YPD 培地、MRS 培地、GYP 培地を用いて安定したドロップレットの生成に成功した。また、温度などの諸条件を検討し、少なくとも 7 日間ドロップレットの状態を維持する条件を確立した。さらに、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Lactobacillus rapi*、*Pediococcus lolii* のドロップレット培養が可能であることを確認した。エマルションドロップレットは封入する溶液や培養温度が耐久性に大きく影響することが明らかとなり、更に安定な条件の検討が必要であるが、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Lactobacillus rapi*、*Pediococcus lolii* などのドロップレット内での培養法を確立したことから、今後様々な環境微生物を用いたエマルションドロップレットによる培養が期待できる。

また、土壌から得た抽出液をドロップレットに封入し、培養することに成功した。隔離効果によって、各ドロップレットで異なる種の生育が確認され、難培養性微生物が増殖している可能性もある。今後、土壌微生物と既知微生物の複合培養や有用物質生産株のスクリーニング等への応用も期待できる。

Microorganisms, droplet, Culture

講演番号：3A01a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A01 会場

サントパイン分解能を有する根粒菌の探索とその特性評価

Screening and characterization of santopine degrading rhizobia

○島崎 智久、元 坤、岡崎 伸、藤井 義晴（東京農工大学・院農）
○Tomohisa SHIMASAKI, Yuan KUN, Shin OKAZAKI, Yoshiharu FUJII (Tokyo University of Agriculture and Technology)

根粒菌などの有用微生物は化学肥料に代わるバイオ資材として注目されている。しかし、実際の土壌環境では常在菌との競合などの理由から、その接種効果は不安定な傾向にあり、バイオ資材開発における障壁となっている。そこで我々は一部の根粒菌が有するサントパイン代謝能に注目した。サントパインはグルコースとグルタミンが縮合することで生成する化合物であり、その輸送・分解に関与する遺伝子群からなる santopine catabolism operon (*soc* operon)は根粒菌を含むごく限られた微生物群に分布している [1)]。そのため、サントパインは接種根粒菌活性化のための栄養基質としての応用が期待される。当研究室ではこれまでに、緑肥として広く利用されているマメ科植物であるヘアリーベッチを宿主とする根粒菌(*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*)を日本全国１３カ所から単離し [2)]、これらの単離株の中から耐塩性および耐酸性菌の選抜を行っている (HK7 株 : 酸/塩耐性, CB4 株 : 塩耐性, KNb13 株 : 酸耐性)。そこで本研究では、これら優良菌株からサントパイン代謝能を有するヘアリーベッチ根粒菌を選抜し、それらの特性評価を行うことを目的とした。

まず、これらの優良菌株に対し *soc* operon に含まれる遺伝子群のうち、サントパイン輸送に関与する基質結合タンパク質をコードする *socA* 遺伝子の単離を試みた。その結果、CB4 株および KNb13 株からこれまでに詳細な機能解析が行なわれている *Agrobacterium tumefaciens* C58 由来 *socA* 遺伝子とそれぞれ 76 %および 80%の相同性を示す配列が得られた。次に KNb13 株の細胞破砕液とサントパインのアナログであるフルクトシルバリンを混合し、薄層クロマトグラフィーに供したところ、フルクトシルバリンの分解が確認された。さらに、これらの菌株について、directional swarm assay 法を用いてサントパインに対する走化性アッセイを行った。

今後、遺伝子欠損株の構築やヘアリーベッチへの接種試験を通じてより詳細な特性評価を行う予定である。

1) Baek *et al*., *FEMS Microbiol Ecol*, 53, 221-233 (2005)
2) Yuan *et al*., *Microbes Environ*, 31(2), 121-126 (2016)

santopine, rhizobia, hairy vetch

講演番号：3A01a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A01 会場

高温性プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝におけるコハク酸脱水素酵素の生理的役割
Physiological functions of succinate dehydrogenases on propionate oxidation in a thermophilic propionate oxidizing bacterium

○津島 由佳[1]、石口 貴之[3]、高坂 智之[1,2]、山田 守[1,2] ([1]山口大院・創科、[2]山口大中高温微生物セ、[3]山口大院・農)
○ Yuka TSUSHIMA[1], Takayuki ISHIGUCHI[3], Tomoyuki KOSAKA[1,2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi University, [2]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, [3]Graduate school of Agriculture, Yamaguchi University)

【目的】メタン発酵におけるプロピオン酸酸化において、最も進みにくい反応であるコハク酸酸化はコハク酸脱水素酵素 (SDH) により触媒されることが知られる。高温性プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (SI) はゲノム解析の結果から、２種類のコハク酸脱水素酵素を有しており、１つは膜結合型 (SDH1) もう１つは可溶型 (SDH2) であると予測されているが、これらの機能およびそのプロピオン酸酸化への寄与は不明である。一方、中温のプロピオン酸酸化細菌はプロピオン酸酸化時の水素放出に ATP 合成酵素由来の膜電位を必要とすることが知られている。つまり、膜結合型 SDH のコハク酸酸化における膜電位依存性が示唆されている。そこで、SI の SDH1 と SDH2 の機能を解析すると共に、SI がプロピオン酸酸化時の水素放出に ATP 合成酵素由来の膜電位が必要かを明らかにすることを試みた。
【方法・結果】まず、粗酵素抽出液および SDH1 を含む膜画分と SDH2 を含む可溶性画分に分画したものを調整し各種酵素活性を測定し比較した。その結果、SDH1 はユビキノン UQ1 を電子受容体にできる SDH であり、SDH2 は NADH を電子供与体とするフマル酸還元が可能であることが示唆された。またピルビン酸で培養した際の粗抽出液によるキノン還元活性はフマル酸で培養した場合よりも高かった。このことから、SDH1 の発現はピルビン酸培養時に高く、SDH2 の発現はフマル酸培養時に高いことが予測された。以上のことから、SDH1 と SDH2 はそれぞれ異なる特徴・機能を持ち、SDH2 は主にフマル酸還元酵素として機能していることが示唆された。一方、SI によるプロピオン酸からの水素放出が脱共役剤および ATP 合成酵素阻害剤により抑制された。この結果から、この一連の反応には ATP 合成酵素由来の膜電位を必要とすることが示された。また、膜結合型 SDH の阻害剤の添加によって水素放出が抑制された。以上の結果より、SI のプロピオン酸酸化時のコハク酸酸化には ATP 合成酵素由来の膜電位を必要とすること、そしてこの反応は SDH1 が主に行うことが示唆された。

succinate dehydrogenase, syntrophic propionate oxidation, membrane potential

講演番号：3A01a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A01 会場

ビフィズス菌のアラビアガム資化性の鍵を握る酵素 endo-1,3-α-L-arabinofuranosidase の機能解析
Functional analysis of endo-1,3-α-L-arabinofuranosidase for the assimilation of gum arabic in bifidobacteria

○佐々木 優紀[1]、堀米 綾子[2]、小田巻 俊孝[2]、清水（肖） 金忠[2]、北原 兼文[1]、藤田 清貴[1]([1]鹿児島大農、[2]森永乳業・基礎研)
○Yuki Sasaki[1], Ayako Horigome[2], Toshitaka Odamaki[2], Jin-Zhong Xiao[2], Kanefumi Kitahara[1], Kiyotaka Fujita[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Morinaga milk industry Co.,Ltd.)

【目的】腸内細菌叢のバランスを保つことが我々の健康維持に重要であるという知見が増加している。アラビアガムは、特定のビフィズス菌を選択的に増殖させる次世代のプレバイオテックとして注目されているが、その分解代謝メカニズムは明らかにされていなかった。これまでに我々は、カラマツ由来アラビノガラクタン-プロテイン（AGP）に対する *Bidobacterium longum* JCM1217 株の分解代謝メカニズムの全容を明らかにした(1)。しかし、本菌株はより複雑な修飾糖が付加されたアラビアガム由来 AGP を分解することはできなかった。既に、*B. longum* JCM7052 株がアラビアガム資化性を示すことが報告されている(2)。そこで、本研究では「ビフィズス菌のアラビアガム資化性の謎の解明」を目指し、アラビアガム資化性の鍵を握る酵素の探索とその機能解析を行った。
【方法・結果】*B. longum* のアラビアガム資化性株２種類と非資化性株 10 種類のゲノムシークエンス解析を行ったところ、アラビアガム資化性株に共通して保存された新規糖質分解酵素 endo-1,3-α-L-arabinofuranosidase（EAFase）遺伝子を見いだした。そこで、*B. longum* JCM7052 株由来の EAFase 遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現と His-Tag を利用した精製を行った。アラビアガムとカラマツ AGP に組換え EAFase を反応させたところ、アラビアガムからは Gal*p*-α1, 3-Ara 及び Ara*p*-β1,3-Ara が遊離し、カラマツ AGP からは Ara*p*-β1,3-Ara が遊離した。また、アラビアガム由来のオリゴ糖からも Gal*p*-α1, 3-Ara 及び Ara*p*-β1,3-Ara の遊離が確認された。本酵素の至適温度は 45℃、至適 pH は 5.5 であった。
【考察】*B. longum* JCM7052 株は、Gal*p*-α1,3-Ara 及び Ara*p*-β1,3-Ara の二糖を EAFase によって遊離し、菌体内に取り込んだ後に分解代謝することによって、アラビアガム資化性を持つことが明らかになった。しかし、その切り出された二糖のうち、Ara*p*-β1,3-Ara を分解するβ-L-arabinopyranosidase は *B. longum* では機能しておらず *B. adolescentis* のみに保存されている(3)。このため、*B. longum* と *B. adolescentis* の間には EAFase によって切り出された Ara*p*-β1,3-Ara を介した共生関係があると考えられる。現在、アラビアガムを炭素源とした *B. longum* と *B. adolescentis* の共培養試験及び、EAFase によって切り出された二糖を炭素源とした資化性試験を行っている。

1) Fujita, K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 4577 (2014); 2) Saishin, N. *et al.*, *J. Biol. Macromol.*, 9, 71 (2009); 3) Shimokawa, M. *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, 62, 1-6 (2015)

gum arabic, bifidobacterium, glycoside hydrolase

発表責任者：藤田清貴（k4022897@kadai.jp）

講演番号：3A01a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A01 会場

Bifidobacterium adolescentis のアラビノガラクタン-プロテイン分解酵素群をコードする遺伝子クラスターの解析

Characterization of a gene cluster encoding the enzymes for arabinogalactan-protein in *Bifidobacterium adolescentis*

○藤田 清貴、嵩下 愛果、東郷 奈未、福元 諒、角町 華子、佐々木 優紀、北原 兼文 (鹿児島大農)
○Kiyotaka Fujita, Aimi Dakeshita, Nami Togo, Akira Fukumoto, Hanako Tsunomachi, Yuki Sasaki, Kanefumi Kitahara (Kagoshima Univ.)

【目的】日本人健常者のビフィズス菌構成の調査の結果、*Bifidobacterium adolescentis* と *B. longum* と *B. pseudocatenulatum* の3種の成人型ビフィズス菌を合わせて保菌する傾向にあることが明らかにされている(1)。我々は、カラマツ由来アラビノガラクタン-プロテイン（AGP）の *B. longum* における分解代謝経路の全容を明らかにすると共に(2)、*B. adolescentis* JCM1275 株由来の AGP 分解代謝に関与すると予想された遺伝子クラスターの解析を進め、2016 年度の本大会において BAD1525 が α-D-galactopyranosidase 活性を合わせ持つ GH27 β-L-arabinopyranosidase であることを報告した。そこで、本研究では BAD1525 の前後の遺伝子クラスターにコードされた AGP 分解酵素群のクローニングとその機能解析を目的とした。
【方法】BAD_1524・BAD_1527・BAD_1528 遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現と His-Tag を利用した精製を行った。酵素活性測定の基質としては、各種 *p*NP 基質、アラビナン、アラビノキシラン、カラマツ AGP、カラマツ AGP から調製した Ara*p*-β1,3-Ara*f*-α1,3-Gal_3 及び Ara*p*-β1,3-Ara を用いた。
【結果】BAD_1524 は AGP の Ara*f* 側鎖に作用する GH51 α-L-arabinofuranosidase であり、BAD1525 と共に Ara*p*-β1,3-Ara*f*-α1,3-Gal_3 に作用させると 2 分子の Ara とβ1,6-Gal_3 への分解が確認された。また、BAD_1527 は広い基質特異性を持つ GH43 α-L-arabinofuranosidase であり、BAD_1528 は Ara*p*-β1,3-Ara 構造を特異的に切断する GH36 で初めてのβ-L-arabinopyranosidase であった。
【考察】Ara*p*-β1,3-Ara は endo-1,3-α-L-arabinofuranosidase によってのみ遊離される二糖であり、Ara*p*-β1,3-Ara*f*-α1,3-Gal_3 は *B. longum* だけが持つ AGP 分解酵素 GH43 exo-β-1,3-galactanase によって遊離されるオリゴ糖である。さらに、BAD_1524・BAD_1525・BAD_1527・BAD_1528 は、シグナルペプチドが付加されていない菌体内酵素である。このため、*B. adolescentis* は *B. longum* によって遊離された AGP 由来のオリゴ糖の一部を菌体内に取り込んだ後に分解代謝しているものと予想される。乳児型ビフィズス菌においては、ヒトミルクオリゴ糖の分解代謝システムの解析により、ビフィズス菌同士でミルクオリゴ糖の分解物を分け合う共生関係が明らかになりつつある。成人型ビフィズス菌間においても AGP の分解代謝を共同で行う共生関係があると考えられる。

1) Kato, K. *et al.*, *Curr. Microbiol.*, 74, 987 (2017)
2) Fujita, K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 4577 (2014).

arabinogalactan-protein, bifidobacteria, glycoside hydrolase

発表責任者：藤田清貴（k4022897@kadai.jp）

講演番号：3A01a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A01 会場

ラットへのコール酸および難消化性オリゴ糖の同時投与による腸内細菌叢改変に基づいたデオキシコール酸生成菌と相互作用する腸内細菌種の探索

Exploration of the intestinal bacteria that interact with deoxycholic acid-producing bacteria in rats based on the modification of the gut microbiota by feeding cholic acid and non-digestible oligosaccharides

○佐竹 実菜子[1]、吹谷 智[1]、佐藤 昌直[1]、石塚 敏[1]、小椋 義俊[2]、林 哲也[2]、横田 篤[1]([1]北大院農、[2]九大院医)
○Minako SATAKE[1], Satoru FUKIYA[1], Masanao SATO[1], Satoshi ISHIZUKA[1], Yoshitoshi OGURA[2], Tetsuya HAYASHI[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyushu Univ.)

【背景と目的】ヒトの腸内には数十兆個、約千種類という多種多様な腸内細菌が存在しており、宿主だけでは不可能な様々な代謝を行う。その代表的な代謝の一つに胆汁酸の代謝がある。胆汁酸は小腸において食事中に含まれる脂質の消化・吸収を補助した後、その一部は大腸に流入して腸内細菌による変換反応を受ける。この際に、ヒトの主要な胆汁酸であるコール酸 (CA) のほとんどが、殺菌活性や細胞毒性の強いデオキシコール酸 (DCA) へ変換されてしまう。しかしながら、この反応を担う DCA 生成菌は *Clostridium* 属に属する限られた腸内細菌種であり、それらが菌叢内で占める割合も総菌数の 100 万分の 1 と非常に少ない。このように菌数と胆汁酸量に矛盾が生じる理由については不明である。我々はこの現象の背景として、多種多様な菌叢内における DCA 生成菌と他の菌種との複雑な相互作用により、DCA 生成が活性化されるのではないかと推測した。そこで本研究では、腸内 DCA 量の増加が観察される CA 投与ラットに対して、数種類の難消化性オリゴ糖を摂取させることで腸内細菌叢構成および腸内 DCA 生成量の変化を誘導し、DCA 量の増減データと各菌種の相対量との相関性を指標として、DCA 生成菌と相互作用する腸内細菌種を見出すことを目的とした。
【方法】3 週齢の Wistar/Slc 雄性ラットを 2 週間予備飼育後、AIN-93G 準拠飼料を与える Control 群、0.05% CA 添加食投与群、0.05% CA 添加食に 6 種類の難消化性オリゴ糖 3%を添加した飼料を与える計 8 群（各群 $n = 3$）に分けて 4 週間飼育した。解剖時に盲腸内容物を採取し、LC/ESI-MS を用いた胆汁酸組成分析および DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした Illumina MiSeq によるメタ 16S 菌叢解析に供した。さらに、腸内 DCA 濃度と菌叢解析により得られた各 OTU（Operational Taxonomic Unit, 配列情報に基づいた分類の単位）の相対量との網羅的な相関解析を行い、DCA 生成菌と相互作用する腸内細菌種を探索した。
【結果および今後の予定】CA 添加食投与群では Control 群と比較して総胆汁酸量および DCA 濃度が増加した。CA+難消化性オリゴ糖摂取群では、糖質の種類により異なる DCA 濃度の増減データが得られた。さらに、腸内 DCA 濃度とメタ 16S 菌叢解析により得られた全 1154 種の OTU の相対量との網羅的な相関解析を行った結果、DCA 濃度と正の相関を示した OTU の中で、その代表配列が既知の DCA 生成菌と高い配列相同性を持つ 5 種類が特定された。今後は、この 5 種類の OTU と全 1154 種の OTU との間で相関解析を行い、DCA 生成菌と相互作用する可能性のある腸内細菌種を探索し、これらの関係性の検証を行う予定である。

bile acids, gut microbiota, microbial interaction

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A01a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A01 会場

マウス糞便からの酸素フリーラジカルの検出、定量ならびに腸内環境評価への活用
Detection and quantification of oxygen free radicals in mouse feces and its possible application for evaluation of intestinal environment

○脇田 義久[1]、斎木 朝子[1]、金田 弘挙[1]、瀬川 修一[1]、土屋 陽一[1]、亀谷 宏美[2]、岡本 晋[2]([1]サッポロホールディングス・価値創造フロンティア研究所、[2]農研機構・食品研究部門)
○ Yoshihisa WAKITA[1], Asako SAIKI[1], Hirotaka KANEDA[1], Shuichi SEGAWA[1], Youichi TSUCHIYA[1], Hiromi KAMEYA[2], Susumu OKAMOTO[2] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]Food Research Institute, NARO)

腸内環境と宿主との相互作用について多大な関心が向けられている。多くの場合、腸内細菌叢および代謝物の視点からの解析がなされている。スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル等の酸素フリーラジカルは細胞内の通常時の代謝において発生し、真核生物、原核生物問わずに毒性を発揮する。これらのフリーラジカルが消化管内で発生し、その恒常性に影響を与える可能性があるが、その存在、生理的意義に焦点をあてた研究報告はほとんどない。本研究では ESR（Electron Spin Resonance）法を用いた腸内フリーラジカル環境の評価方法の確立を目的とした。

最初に ddY マウスを用いて糞便および消化管におけるフリーラジカルの検出・比較を試みた。ddY マウスの糞便を回収した後、スピントラップ溶液で懸濁した。一方、消化管内のラジカルを測定するため、腸管ループ法を用いて小腸および大腸にスピントラップ溶液を注入した。糞便および消化管ともに 30 分反応後、ESR により測定を行った。その結果、全てのサンプルからヒドロキシラジカルが検出された。さらには、大腸および糞便で検出されたヒドロキシルラジカル量に大きな差はなく、糞便中ヒドロキシルラジカルが大腸内のフリーラジカル環境のマーカーとなり得ることが示唆された。

次に、遺伝的背景の異なる 3 系統のマウス(ddY、C57BL/6、ICR)を用いて糞便中ヒドロキシルラジカル量を比較した。その結果、ddY は他の系統と比較して有意に産生量が高いことが確認された。ヒドロキシルラジカルが消化管に対して何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、これら 3 系統のマウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウムによる大腸炎誘発時の生存率について比較したところ、ddY は他の 2 系統よりも有意に生存率が低下した。このことから、腸内環境中のフリーラジカルが腸管の恒常性に悪影響を及ぼす可能性が推察された。

以上の結果、糞便中のフリーラジカルが腸内フリーラジカル環境のマーカーとなり、且つ腸管フリーラジカルが宿主に影響を及ぼしていることが考えられた。今後、腸内環境が宿主に及ぼす影響を検討する際に、腸内細菌叢や代謝物評価に加え、フリーラジカルの評価も実施することで、新たな知見が生まれるのではないかと考えている。

intestinal environment, free radical, ESR

発表責任者：脇田義久（yoshihisa.wakita@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：3A01a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A01 会場

発酵制御因子により集積される高耐性グリセリン分解菌の菌叢解析

Analysis of highly glycerol-resistant glycerol-degrading bacteria accumulated by fermentation promoter

○倉橋 健介[1]、日髙 光將[1]、徳本 勇人[2]([1]阪府大高専、[2]阪府大・理)
○Kensuke Kurahashi[1], Mitsuhiro Hidaka[1], Hayato Tokumoto[2] ([1]OPUCT, [2]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】

BDF 製造時の副生成物である廃グリセリンは未反応の原材料に加え高アルカリ性の触媒を含むことから精製にコストがかかり、その処理が問題となっている。発表者らのグループは消化醗酵汚泥を用いた廃グリセリンの嫌気発酵分解において、発酵制御因子としてごく微量のグルコースを加えることで、消化発酵汚泥単体では分解することのできない高負荷のグリセリンを水素へ変換できることを見出した[1)]。しかしながら、グルコースの添加によって集積された高耐性グリセリン分解菌叢の構成菌は判明しておらず、発酵制御因子であるグルコースが劇的なグリセリン分解を発現させるメカニズムや、その際に菌叢が示すグリセリン分解活性などについても不明な点が多い。そこで、本研究においてはこのようにして集積された高負荷グリセリン分解菌叢の構成微生物をプレート培養によって分離するとともに、PDR-DGGE 法による 16S rRNA を標的とした遺伝子解析によって同定することで、プロセスの連続化における操作因子を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

発酵制御因子であるグルコース投与下で、半回分操作を繰り返すことで高負荷グリセリンを連続的に分解させ、高耐性グリセリン分解菌を集積した。集積された菌叢をプレート培養によりコロニーごとに分離し、PCR-DGGE 法を用いた 16S rRNA 遺伝子解析による菌叢構造解析を行ったところ、*Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia phenoliruptrix*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Clostridium pasteurianum* の 5 種の構成菌種が同定できた。構成菌種のうち、*C. pasteurianum*, *B. licheniformis*, *B. vietnamiensis* および *B. phenoliruptrix* はグリセリンとグルコースの両方を基質として利用可能な菌であり、高負荷のグリセリンに対する耐性を有する。そのため、他の菌が高負荷のグリセリンにより発酵停止状態となったところで、添加した微量のグルコースを利用してこれらの菌が増殖することで、高濃度でもグリセリンを劇的に分解したことがわかった。また、*C. pasteurianum* はグリセリンに高い耐性を持つ水素生成菌であることから[2)]、グリセリンがより高負荷である発酵初期に優勢化することでグリセリンの水素への変換が起こったと考えられる。

【参考文献】

1) Tokumoto, H. and Kashiwagi, M., *Bioresour. Technol.* **2012**, *126*, 13-17.
2) Dabrock, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 1233-1239.

crude glycerol, fermentation promoter, PCR-DGGE

講演番号：3A01a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A01 会場

軽油分解メタン発酵微生物群集の群集構造解析

Prokaryotic community structure under methanogenic degradation of diesel fuel

○原田 智菜[1]、佃 玲奈[2]、稲葉 桂子[1]、野村 泉[1]、上原 葵[1]、鈴木 徹[1,2]、中村 浩平[1,2]([1]岐阜大応生、[2]岐阜大院応生)
○Tomona HARADA[1], Reina TSUKUDA[2], Keiko INABA[1], Izumi NOMURA[1], Aoi UEHARA[1], Tohru SUZUKI[1,2], Kohei NAKAMURA[1,2] ([1]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Grad School Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

現在、最も利用比率の高いエネルギー資源である石油（原油）は、振興国における経済発展により益々その需要を増している。その一方、油田には多くの原油が残存しており、採油コストの問題から回収が困難となっている。この問題に対し、微生物によって原油を分解し、よりエネルギー効率の高いメタンに変換して回収する方法が提唱されている。Zengler ら（Nature, 1999）により、原油の主成分である *n*-アルカン分解しメタン生成する微生物群集が発見された。この群集にはアルカン分解菌とメタン生成アーキアが存在し、これらの微生物の共生によってアルカン分解メタン生成が起こると考えられている。しかし、メタン生成環境下における *n*-アルカン分解は極めて遅いため、*n*-アルカンからメタンに至るまでの分解経路やそれを担う微生物（特にアルカン分解菌）に関する知見は不十分である。本研究では軽油を唯一の基質としたメタン生成培養系を構築し、アルカン分解メタン生成反応の鍵となる微生物の特定を目的とした。

新潟県新潟市の新津川原油湧出地から底泥試料を採取し、無機塩培地に嫌気的に植菌した。その培地に軽油を加えた系と、非添加系を用意し暗所 30℃にて静置培養を行った。228 日間の培養で、軽油非添加系と比較して、添加系において有意なメタン生成が確認された。培養 560 日目に、軽油添加系と非添加系の培養液と植菌源試料から DNA を抽出し、Miseq によるメタ 16S 解析を行った。その結果、軽油非添加系と比較して添加系では、*Firmicutes* 門細菌の割合が減少し、*Proteobacteria* 門細菌の割合が増加した。中でも *Deltaproteobacteria* 綱の *Smithella* 属細菌が優占種となり、これはイギリスの Tyne 川底泥試料を植菌源とした原油分解メタン生成系においても優占種であった（Gray ら、Environmental Microbiology, 2011）。一方、アーキアにおいては酢酸資化性メタン生成アーキアが優占種であり，水素資化性のメタン生成アーキアが優占した Gray らの上記報告とは異なった。また、アルカン代謝経路を推定するために、嫌気的アルカン代謝酵素（アルキルコハク酸合成酵素，Ass）遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR を行った。その結果、本培養系から Ass 遺伝子の増幅が確認され、クローンライブラリー解析によって *n*-アルカン（C_6 から C_{12}）を分解する異化的硫酸塩還元細菌である *Desulfoglaeba alkanexedens* と、メタン生成環境下 *n*-アルカン（C_6 から C_{10}）分解を担うと考えられる *Peptococcaceae* bacterium と近縁の種の存在が示された。これらのアルカン分解細菌の近縁種が本培養系内のアルカン分解に関与している可能性が示唆された。

crude oil, alkylsuccinate synthase, methanogenesis

講演番号：3A01a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A01 会場

固体表面への付着現象に基づく複合微生物の分離技術の開発
Development of isolation methodology of environmental microbe based on adhesion phenomena to solid surface
○酒井 智子、大西 章博、藤本 尚志、蒋 紅与（東農大）
○Tomoko SAKAI, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Hongyu JIANG (Tokyo Univ. Agric)

【背景と目的】自然界の複合微生物系は多種多様な菌種で構成されており、1 g あたりの個体数は 10^9 個に達することがある。このため、環境微生物学の分野における生態解析には培養法に依存しない分子生物学的技術が用いられている。これまでの技術は生態系の多数派となる優占菌種の解析が対象であったが、近年利用されるようになった次世代シーケンサーなどの手法では、個体数が全体の 0.1%を下回る少数派の微生物の解析も進みつつある。しかしながら、分子生物学的技術では生きた細胞を獲得することは不可能であることから、複合微生物系における少数派の微生物を生きたまま分離培養する新たな手段が必要である。

本研究では、微生物細胞の物理化学的な性質に基づき、少数派の微生物を獲得するための技術開発を試みる。これまでに自然界の複合微生物系が固体表面に対して吸着および滑落する過程で、生態系における個体数が優占菌種の千から 10 万分の一程度の少数派の微生物を獲得できることを明らかにした。今回は純粋培養菌体を用い、ガラス表面に対する吸着と剥離の過程で、異なる菌種が分別される現象を観察した結果について報告する。

【実験材料と方法】大腸菌 *Escherichia coli* 及び黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の菌体懸濁液を OD_{660}≒10^{-1}～10^{-5} の間で段階的に調整した。滅菌したガラス管に菌体懸濁液を充填し、3 分間停留させ、その後滅菌した緩衝液を送液してガラス管内から細胞を洗い出した。洗浄液は一定の間隔で分取し、約 200 画分を回収した。その後、各分画液を人口培地で培養し、微生物細胞の増殖に基づいてガラス表面から微生物細胞が滑落する程度について評価した。

【結果及び考察】大腸菌と黄色ブドウ球菌との間には、細胞の滑落の程度に違いが見られ、いずれの濃度に調整した菌体懸濁液においても同様の傾向が見られた。また、各微生物の菌体懸濁液を等量混合した実験では、分画された 60 の洗浄液で微生物細胞の増殖が確認された。このうちの約 30 試料において増殖した微生物を判別した結果、20 試料では大腸菌、10 試料では黄色ブドウ球菌のみが増殖していることが確認された。

このように、本実験で用いた大腸菌と黄色ブドウ球菌は、ガラス表面に対する吸着及び滑落の過程で、両者が含まれる複合微生物の懸濁状態から細胞を生きたまま分別できる可能性が示された。

microflora, isolation methodology, microbial attachment

講演番号：3A01a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A01 会場

時空間的不均一環境において緑膿菌の進化動態を規定する適応形質と種間相互作用の寄与

Adaptive phenotypes and interspecies interactions governing evolutionary dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in spatiotemporally heterogeneous environments

○山本 京祐[1,2]、草田 裕之[2]、鎌形 洋一[2]、玉木 秀幸[1,2,3]([1]筑波大生命環境、[2]産総研生物プロセス、[3]東大生セ)
○Kyosuke YAMAMOTO[1,2], Hiroyuki KUSADA[2], Yoichi KAMAGATA[2], Hideyuki TAMAKI[1,2,3] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]AIST, [3]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】日和見感染菌として知られる緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、幅広い表現型可塑性や迅速な進化によって宿主内から野外環境まで多様な環境において高い適応能力を示す。細菌の棲息環境の多くは空間的に不均一であるが、そうした不均一環境において緑膿菌は多細胞的生育形態であるバイオフィルム（BF）を形成することが知られている。BF 集団内からは BF 形成能の向上した進化株が出現することが実験的に示されているが、BF 形成と他の形質（運動性等）との間にはトレードオフがあることも示唆されており、BF の生活環（集合、増殖、離散）を繰り返す中でこうした進化株が実際に選択・維持されるのかという点や、適応過程へのその他の形質の寄与については不明な部分が多い。本研究では、モデル進化実験系を用いて不均一環境における緑膿菌の進化動態を精査することで、BF 形成やその他の形質が適応過程においてどのように変化し、維持されるかを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】緑膿菌 PAO1 株を静置条件下で約 3 週間継代培養（24 時間ごとに撹拌・分散し、1%（v/v）を新鮮培地に植継ぎ）することで、時空間的に不均一な環境条件で進化実験を実施した。PAO1 株は気液界面に BF を形成しながら生育し、培養開始 3~5 日程度でコロニー形態の変化した様々な進化株が現れ始め、その後集団内で優占化していった。複数の代表的な進化株について生理試験およびゲノム解析を実施したところ、表現型の変化は BF 形成能の向上と運動性（twitching）欠損に大別された。高 BF 形成株は徐々に集団内頻度が増加するのに対して、運動性欠損株は出現後急激にその頻度が増加し、より強い適応効果が示唆された。運動性に必要なピリ線毛は緑膿菌ファージの宿主細胞付着部位のひとつであり、運動性欠損株出現時に培養液中のファージ粒子濃度が大きく増加していたことから、BF 形成能向上だけでなくピリ欠損等によるファージ感染への耐性も適応過程において重要であることが明らかとなった。一方、実環境中では異種微生物と共存することが一般的である点を考慮し、異種細菌 *Staphylococcus aureus* との共培養系においても同様に進化実験を実施した。その結果、*S. aureus* との共培養系では緑膿菌単独培養系に比べて早い段階で運動性欠損株が現れるケースがみられ、種間相互作用が直接もしくは間接的に緑膿菌の進化動態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

evolution, adaptation, biofilm

講演番号：3A01a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A01 会場

Kaistia sp. 32K 株との共培養時における *Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上とバイオフィルム形成への影響

Effect of up-motility and biofilm formation of *Methylobacterium* sp. ME121 in co-cultivation with *Kaistia* sp. 32K

○薄井 祥明[1]、若林 佑[1]、清水 哲[2]、中村 顕[2]、伊藤 政博[1]([1]東洋大院 生命科学、[2]筑波大 生命環境系)

○Yoshiaki USUI[1], Yuu WAKABAYASI[1], Tetsu SHIMIZU[2], Akira NAKAMURA[2], Masahiro ITO[1] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【背景、目的】

これまでの細菌の研究では、対象となる一種類の細菌の解析を行うことが主であったため、単離した細菌を単独で培養することが主流であった。しかし、実際の自然界では多くの細菌同士が互いに影響しあいながら棲息していることから、近年では異なる種間の細菌同士を意図的に混合し培養する共培養の研究報告が増加している。本研究では、細菌の共培養時における運動性の向上に着目した。同一の土壌サンプル中から単離された *Methylobacterium* sp. ME121 株（運動性あり、ME121 株）と、*Kaistia* sp. 32K 株（運動性なし、32K 株）を本研究で使用した。これまでの研究結果より、ME121 株と 32K 株の共培養時と ME121 株の単独培養時での遊泳速度を比較すると、共培養時の方が ME121 株の有意な運動性の向上が観察された。また、32K 株の培養上清を用いた場合でも遊泳速度の向上が観察された。このことから、32K 株培養上清に、ME121 株の運動性向上因子（K 因子と命名）が存在することが明らかとなった。また、K 因子により、ME121 株のべん毛モーターの回転力が上昇することで運動性が向上すると推察されてきた。K 因子は、中性糖を含む物質であることを明らかにしている。そこで、K 因子は、32K 株の生産する菌体外多糖類の一種ではないかと考えた。今回は、ME121 株と 32K 株の共培養時と、ME121 株、32K 株の単独培養時におけるバイオフィルム形成量に着目し研究を行った。

【結果、今後の展望】

バイオフィルム形成量はクリスタルバイオレット染色法を用いて評価した。合成培地において、ME121 株はバイオフィルムを形成しないが、32K 株はバイオフィルムを形成することが明らかとなった。ME121 株と 32K 株の共培養時と 32K 株の単独培養時で比較すると、共培養時の方が有意なバイオフィルム形成量の増加が観察された。大腸菌や緑膿菌と 32K 株の共培養時では、バイオフィルム形成量の増加は観察されなかった。次に、合成培地ではなく、32K 株の培養上清を用いてバイオフィルム形成量を観察した。32K 株培養上清において、ME121 株がバイオフィルムを形成することが明らかとなった。このことから、32K 株が生産する物質によって ME121 株がバイオフィルムを形成するようになり、共培養時に、より大きなバイオフィルムを形成しあうことが推察された。今後は K 因子の精製を行い、詳細な成分分析や分子サイズの同定を行うことと、K 因子による ME121 株の運動性向上の作用機序を解明したいと考えている。さらに、バイオフィルム形成の促進と ME121 株の運動性向上との関係を明らかにしていきたいと考えている。

co-cultivation, biofilm, *Methylobacterium*

発表責任者：薄井 祥明（ysak4415@gmail.com）

講演番号：3A01p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A01 会場

食物アレルギーモデルマウスにおける OVA 発現乳酸菌経口投与の影響

The impact of orally administered ovalbumin-expressing lactic acid bacteria in a murine model of food allergy

○皆広 嘉慧[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院農化、[2]東農大応生科)
○Yoshie MINAHIRO[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】

食物アレルギーは特定の食物抗原に対する免疫系の異常な反応であり、現在根本的な治療法が模索されている。乳酸菌はアレルギー抑制効果を持つことが過去の研究において多数報告されており、経口摂取における安全性が高いことからワクチンや生理活性物質の経口運搬体として応用が試みられている。したがって、抗アレルギー作用と抗原運搬機能を併せ持つ乳酸菌は、抗原特異的なアレルギー抑制への応用が期待されている。そこで本研究では、食物抗原を発現する乳酸菌を作製し、食物アレルギーモデルマウスに経口投与することで、その免疫調節作用を評価することを目的とした。

【方法】

乳酸菌用発現ベクターにコドンを適正化した合成卵白アルブミン(OVA)遺伝子全長または OVA T 細胞エピトープ配列を挿入した。作製したプラスミドを *Lactobacillus paracasei* IGM394、*Lactobacillus plantarum* NRIC 0380 へ導入し、OVA 抗原を菌体表層に発現する乳酸菌を作製した。

Balb/c マウスに OVA を含む混合物を経口投与することで OVA 特異的 IgG1 抗体産生を誘導した食物アレルギーモデルマウスに OVA 発現組換え乳酸菌死菌体を一定期間経口投与した。再度の OVA 経口投与によりアレルギー応答を惹起後、血液、脾臓、パイエル板を回収した。血清では ELISA により OVA 特異的抗体価を測定し、脾臓細胞・パイエル板細胞では OVA 存在下で 72 時間培養後、培養上清中の IL-4、IL-10、IFN-γ産生量を測定した。

【結果・考察】

Western blot および Flow cytometry により、*L. paracasei* IGM394 表層における OVA の発現を確認した。これを用いて動物試験を行ったところ、OVA 特異的 IgE, IgG1 については OVA 発現乳酸菌の投与による有意な減少はみられなかった。一方、脾臓細胞においては、OVA 発現乳酸菌投与による IFN-γ産生量の有意な増加がみられた。以上の結果より、OVA 発現乳酸菌 *L. paracasei* の経口摂取により OVA 特異的免疫応答の Th1 シフトによるアレルギー抑制効果の可能性が示唆された。現在、*L. plantarum* NRIC 0380 を対象とした同様の動物試験を行っている。

Lactic acid bacteria, food allergy, immune response

講演番号：3A01p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A01 会場

排便時に発生するガス成分による腸内環境スクリーニング法の研究

Study of intestinal environmental screening method by gas component during the discharging stool

渡辺 瑞希[2]、○加藤 完[1]、中西 裕美子[1]、新（田口） 奈緒子[1]、伊藤 鮎美[1]、池田 麻衣[2]、木塚 里子[2]、竹下 朱美[2]、大野 博司[1]（[1]理研統合生命、[2]TOTO）

Mizuki Watanabe[2], ○Tamotsu Kato[1], Yumiko Nakanishi[1], Naoko Atarashi-Taguchi[1], Ayumi Ito[1], Mai Ikeda[2], Satoko Kiduka[2], Akemi Takeshita[2], Hiroshi Ohno[1] ([1]Riken IMS, [2]TOTO)

腸内では数百種類におよぶ腸内細菌が生育しており相互に関係を及ぼし合いながら複雑な腸内エコシステムを構成している。腸内細菌は免疫機能の亢進や蠕動運動を促すなどの腸内環境を改善する効果を持つ細菌が存在する一方で、産生されるアンモニアや硫化水素などを含む腐敗産物等などが蠕動運動を低下させ、便秘等を引き起こし、腸内ガスの悪臭を引き起こすことも知られている。腸内ガスは一般的に腸内環境を評価する 1 つの指標として考えられているが、実際に腸内細菌と腸内ガスとの関係についての詳細は明らかになってない。

本研究では、ガスの成分から腸内環境や腸内細菌叢を予測することを目的とし、数十名のボランティアから排便時のガスおよび糞便を回収した。糞便中細菌叢の構成、糞便中メタボロームおよびガス成分の解析に加えて排便回数や食事内容の情報を含む多数の情報を組み合わせ、腸内ガスの測定からヒトの腸内健康のバロメーターとして使用できるか検討した。排便回数の多少、快便であるか便秘であるかを 1 つの指標とし、各群での腸内環境やガス成分の違いについてお示しするとともに、ガス成分と腸内環境との関係について報告する。

ecosystem, microbiome

講演番号：3A01p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A01 会場

ヒト皮膚常在細菌の相互作用に関する研究
in vitro interactive analysis of resident bacteria on human skin

○笹原 榛華、島村 裕子、増田 修一、大橋 典男（静岡県立大学）
○Haruka SASAHARA, Yuko SHIMAMURA, Shuichi MASUDA, Norio OHASHI (University of Shizuoka)

【目的】一般的なヒトの皮膚常在細菌の一つであるコリネバクテリウム属菌は、近年、遺伝子解析によって、様々な菌種が存在することが明らかとなってきた。しかし、実際に日本人の皮膚からコリネバクテリウム属菌を分離し、その性状について調べた報告は少ない。また、様々な感染症やアトピー性皮膚炎に関与している黄色ブドウ球菌は、コリネバクテリウム属菌と共存する例が少ないことが報告されている。そこで、本研究では、ヒト皮膚由来のコリネバクテリウム属菌を分離し、その菌体外成分が黄色ブドウ球菌の増殖および病原因子の発現に及ぼす影響について調べた。
【方法】被験者 (20 代男女) の前額、頬、首などの表皮 (5×5 cm^2) から、0.1%Tween80 添加 0.15 mol/L NaCl で湿らせた滅菌綿棒を用いて、皮膚細菌を採取した。採取溶液の一部から、黄色ブドウ球菌および皮膚常在菌であるコリネバクテリウム属菌の分離を行った。黄色ブドウ球菌の分離には、選択培地である卵黄添加マンニット食塩培地を用いた。コリネバクテリウム属菌の分離には、Tween80 添加 5% 羊血液寒天培地を用い、形成されたコロニーをグラム染色した後に形態観察を行った。特徴的な形態から、コリネバクテリム属菌であると思われるものを選択し、PCR 法によって *rpoB* 遺伝子の増幅で確認した。*rpoB* 遺伝子の増幅を確認できたものに関して、シーケンスにより菌種を同定した。分離したコリネバクテリウム属菌の培養上清を黄色ブドウ球菌に添加して培養し、経時的に培養後の濁度 (OD 600 nm) の変化を調べた。
【結果および考察】被験者の皮膚細菌採取溶液の一部から、黄色ブドウ球菌と数種類のコリネバクテリウム属菌を分離した。分離したコリネバクテリウム属菌について、*rpoB* 遺伝子をもとに系統樹を作成したところ、クラスターが大きく 2 つに分かれた。コリネバクテリウム属菌の培養上清を黄色ブドウ球菌に添加して培養したところ、培養初期 (3 時間) において、黄色ブドウ球菌の増殖が有意に抑制された。また、黄色ブドウ球菌の増殖抑制の程度は、コリネバクテリウム属菌の種の違いによって異なっていた。現在、コリネバクテリウム属菌の菌体外成分が黄色ブドウ球菌の病原因子の発現に及ぼす影響について検討中である。さらに、被験者の皮膚細菌採取溶液から DNA 抽出を行い、次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたメタゲノム解析を進めている。

resident bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp.

講演番号：3A01p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A01 会場

布製レンタルおしぼりから単離した Brevibacillus reuszeri NIT02 株のドラフトゲノム解析
Draft Genome Sequence of Brevibacillus reuszeri strain NIT02, Isolated from a Oshibori

○安楽 飛伽[1]、佐野 健一[1,2] ([1]日工大院環境共生、[2]日工大工)
○Asuka Anraku[1], Ken-Ichi Sano[1,2] ([1]Grad. Sch. Nippon Inst. Tech., [2]Nippon Inst. Tech.)

国内の飲食店の多くで利用されている布製のおしぼりは、使用後、回収され、洗濯した後、70℃の次亜塩素酸ナトリウム処理によって滅菌され、包装機を用いてナイロン袋に詰められる。しかしながら、滅菌後数ヶ月の期間が経過したおしぼりからは、衣服の洗濯の生乾きと同様の不快な臭いを生じることが、経験上知られている。洗濯物の生乾きの臭いや、濡れ汚れた衣服などの不快臭の原因は、布中に残る微生物の代謝産物に由来することが、先行研究から明らかになっている。

布製のおしぼりには、厚生労働省によって定められた衛生基準があり、*Staphylococcus* 属は、検出されないことと定められている。他方、先行研究からは、衣類の洗浄に次亜塩素酸ナトリウムを用いた際、*Staphylococcus* 属が残存するという報告もあった。そこで我々は、滅菌処理後 3 ヶ月以上経過した布製おしぼりから菌体を回収、ゲノム DNA を抽出した後、PCR を用いて 16S rRNA の増幅・配列解析をおこなった。その結果、分類上、広義の *Bacillus* 属に位置する *Cohnella* 属に由来する複数種の 16S rRNA が検出された。一方、*Staphylococcus* 属は検出されなかった。このことは、滅菌後時間経過した布製おしぼりが、この衛生基準を満たしていることを示す。また、広義の *Bacillus* 属は、前胞子を形成することができる。そのため、70℃の次亜塩素酸ナトリウム処理によっても死滅することはなく、滅菌後のおしぼりに前胞子として残存し、その後、次亜塩素酸の揮発に伴う濃度低下と共に出芽し、検出された可能性が高い。洗濯物の生乾きの臭いは、しばしば納豆様臭とも形容されることがある。そのため我々は、広義の *Bacillus* 属が滅菌後時間経過したおしぼりの不快臭の原因であると考えた。

現在、我々はおしぼりから *Bacillus* 属を単離し、そのゲノム解析から不快臭の代謝経路を明らかにすることを目指している。滅菌処理後、時間経過したおしぼりから菌体を回収し、標準寒天培地を用いて単離し、4 クローンを得た。16S rRNA の解析から、これら 4 つのクローンは全て広義の *Bacillus* 属に位置する *Brevibacillus reuszeri* および、*Bacillus megaterium* であった。このうち、*B. reuszeri* strain NIT02 と名付けた株について、ドラフトゲノム解析をおこなった。明らかにしたドラフトゲノム全 7,127,729 bp の GC 含量は 46.92%であった。また、6,774 の ORF と 121 の tRNA 遺伝子、10 の Bacillaceas-1 RNA モチーフが見られた。今後は、パスウェイ解析を進め、滅菌後時間経過したおしぼりの不快臭の原因を明らかにする。

Genome, Bacillus, Public health

発表責任者：佐野　健一（kisano@nit.ac.jp）

講演番号：3A01p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A01 会場

分子生物学的手法を用いた空中浮遊菌の迅速検出法の確立

Establishment rapid detection methods of pathogenic microorganisms in the air

○徳田 玲香、岩谷 駿、梶原 将 (東京工業大学)
○Reika Tokuda, shun Iwatani, Susumu Kajiwara (Tokyo Institute of Technology)

【背景】近年、結核菌やマイコプラズマ菌などの病原菌を原因とする空気菌感染による院内感染などが問題視されている。また、空気感染は感染者の咳やくしゃみによって、空気中に病原菌が拡散し、それを健常者が吸い込むことで引き起こされる。よって、空気中に拡散した病原菌の検出および定量が可能となれば、医療現場などにおける空気感染の予防に寄与できると考えられる。現在、空気中の病原菌の検出には、主に培養法が用いられている。この方法は非常に簡便ではあるが、培養の過程を経るため、結果を得るまでに数日から一週間ほど要する。さらに、培養が困難な菌種も存在するなど、従来の方法である培養法には問題点が多くある。そこで、本研究では、培養法に代わる、分子生物学的手法を用いた、より迅速かつ高感度な空気中の病原菌の定量的検出法の検討を行った。
【方法・結果】本研究では専用の吸引装置（MD８ エアスキャン, ザナトリウス社)を用いて、空気の吸引を行い、回収した菌をそのままＲＴ－ｑＰＣＲによる検出、定量を行った。はじめに通常の室内環境中に存在する細菌群、真菌群を吸引装置で回収し、検出を行うことができるのか、真菌及び細菌のｒＤＮＡ配列を標的としたプライマーを用いて確認を行った。天気や室内の温度、湿度によって菌体数の変化はあるが、真菌が５×１０^{1}～２×１０^{2}ｃｅｌｌｓ、細菌が１．４×１０^{3}～１０^{5}ｃｅｌｌｓとそれぞれ検出された。これは、通常の室内環境中に存在すると考えられる菌体数と同程度であった。よって、本研究で用いている装置及びＲＴ－ｑＰＣＲで通常の室内環境中の細菌群、真菌群の回収と検出が可能であるとわかった。また、培養法との比較では検出された菌体数が圧倒的に多いことから、ＲＴ－ｑＰＣＲの方が高感度であると示唆された。次に特定の菌の回収及び検出が行えるかの、確認を行った。区切られた空間（１．５ ｍ×１．５ ｍ×２．０ ｍ)に医療用ネブライザ（ＮＥ－Ｃ２８ コンプレッサー式ネブライザ，オムロン)を用いて、乳酸菌（*Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ． ｌａｃｔｉｓ* ＩＬ１４０３)を約１×１０^{9} ｃｅｌｌｓ散布し、ＲＴ－ｑＰＣＲを行った。結果、空間内に十分量の乳酸菌が存在すれば、その菌種のみを検出でき、散布する乳酸菌量を約１×１０^{3} ｃｅｌｌｓまで減らしても、検出できることが分かった。
【今後の予定】今後はさらに散布する乳酸菌量を減らし、本研究での検出法における細菌群の検出限界を調べる予定である。そして、病原菌に特異的なプライマーをデザインすることにより迅速かつ高感度な空気中の病原菌の検出法の確立を目指していきたい。

pathogenic microorganism, airborne, RT-qPCR

発表責任者：徳田 玲香（tokuda.r.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：3A02a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A02 会場

植物栽培における有機施肥と化学施肥土壌の細菌数及び細菌叢の変化
Change of bacterial count and bacterial flora in organic fertilizer and chemical fertilizer soils in plant cultivation

○原田 栞[1]、森谷 政孝[1]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2]（[1]立命大院生命、[2]立命大生命）
○Shiori HARADA[1], Masataka MORIYA[1], Kiwako S. ARAKI[2], Motoki KUBO[2] ([1]Ritsumeikan Grad., [2]Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】
連作とは同じ作物を同じ耕地に繰り返し栽培することで、連作により生育や収量が次第に低下する連作障害の発生がみられる。特に地下部を薬用として利用する薬用植物では、植物の栄養吸収による土壌成分の偏りや根から漏出する薬効成分の残留が土壌の菌叢を変化させ、連作障害が生じる原因になっていると考えられる。

本研究では、植物の栽培に伴う細菌叢の変化が連作障害を助長させると考え、土壌中の総細菌数および細菌叢に着目した。また土壌細菌の挙動は土壌成分の影響を受けるため、施肥による土壌中の細菌数の変化の違いおよび細菌叢変化による植物へ影響の解明を目的とした。

【方法・結果】
はじめに、黒ボク土、山土、野外の土壌を 1：1：1 (v/v/v%) で混合した。この土壌に 1.5%の牛糞堆肥を施肥したものを有機施肥の土壌とした。また、化学肥料の N：100 mg/kg、P_2O_5：100 mg/kg、K_2O：100 mg/kg を加えたものを化学施肥の土壌とした。これらにホウレンソウを栽培し、1 週間ごとに計 7 回土壌のサンプリングを行った。これらの栽培土壌を用いて DNA 抽出を行い、細菌数の解析および PCR-DGGE 法による菌叢の解析を行った。その結果、有機施肥の土壌では 3 週目までは総細菌数が増減したが、4 週目以降は減少した。化学肥料の施肥では、増減は見られるが総細菌数の変化はあまり見られなかった。

次に、バーミキュライトと山土を 1：1（v/v%）で混合し、この土壌に牛糞堆肥および油かすを 10%、1%（w/w%）加えたものを有機施肥の土壌とした。化学施肥の土壌は上記に示したものを加えた。これらにトウキを栽培し、1 ヵ月ごとに計 6 回土壌サンプリングを行った。トウキにおいて、有機施肥の土壌では栽培期間が 4 ヵ月目までは総細菌数は減少し、5 ヵ月目で上昇した。一方、化学施肥の土壌では細菌が検出されなかった（＜6.0×10^6 cells/g-soil）。PCR-DGGE のバンドパターンから有機施肥の土壌の菌叢解析では 4 ヵ月目の土壌において菌叢の変化が見られた。一方、化学施肥した土壌は菌叢を解析するのに十分な細菌が認められなかった。以上の結果から植物の栽培において土壌微生物数の減少および土壌の菌叢の変化が起こり、その変化は土壌環境により異なることがわかった。このことが生育不良や連作障害を引き起こしている可能性が示唆される。

PCR-DGGE, bacteria, Angelica acutiloba

講演番号：3A02a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A02 会場

洗濯衣類のバクテリア叢と洗濯工程におけるバクテリア叢変動の解析

Analyses of bacterial flora in the laundry and their transitions during washing with washing machines.

○野田 浩史[1]、松村 吉信[1,3]、井上 貴晴[1]、冨岡 敏一[1]、脇田 克也[2]（[1]関西大・生命生物工、[2]パナソニック（株）、[3]関西大・ORDIST）
○Hirofumi NODA[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,3], Takaharu INOUE[1], Toshikazu TOMIOKA[1], Katsuya WAKITA[2] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol., Kansai Univ, [2]Panasnonic co. Ltd., [3]ORDIST, Kansai Univ.)

【目的】近年の清潔志向および感染症予防の観点から、衣類や綿布類の洗濯工程における微生物制御に非常に高い関心が示されている。一方で、衣類や綿布類の使用と洗濯工程を繰り返すことで、洗濯・乾燥直後でも微生物に起因する不快な強い臭いが感じられる場合がある。この原因について複数の研究機関から一部のバクテリアの生育・代謝が原因であると報告されているものの報告されたバクテリアおよび異臭成分は研究機関によって異なっている。そこで当研究室では洗濯槽および洗濯水に存在している微生物ならびに洗濯後の綿布に付着している微生物の種類と細胞量を計測し、微生物細胞と異臭との関連を検証している。さらに本研究では、綿布に付着しやすい微生物細胞の単離とその構造上の特徴を確認すると共に、微生物細胞を効果的に脱離させる洗濯工程の開発も試みている。
【方法】洗濯物試料には未使用綿布とすでに異臭が感じられる綿布を用いた。微生物細胞数は、細胞をクリスタルバイオレットで染色後、バクテリアカウンターを用いた顕微鏡観察法で計測した。細胞の死細胞割合は、死細胞を PI、生細胞を CFDA、全細胞を SYTO9 で染色後、蛍光顕微鏡観察で計測した。バクテリアおよび真菌類の単離にはそれぞれ TSB 寒天培地（37℃培養）および PDA 培地（25℃培養）を用いた。試料中のバクテリア叢解析は Illumina 社 Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子領域を指標としたメタゲノム解析で行った。綿布試料中の微生物細胞の回収はストマッカー法を用い、DNA 回収は DNeasy PowerWater kit を用いた。洗濯処理は一般的な洗濯機および洗濯洗剤を用い、乾燥工程は屋外（外干し）と屋内（部屋干し）で行った。
【結果】異臭綿布に付着していた微生物細胞数を計測すると$>10^8$ cells/g となり、新品綿布での検出限界以下（$<4.0\times10^6$ cells/g）よりも顕著に多くの細胞が付着していた。これらのバクテリア叢をメタゲノム解析した結果、Moraxellaceae, Rhodobacteraceae、Caulobacteraceae が優占種であった。また、これらは洗濯に使用した水道水や洗濯中の洗濯水からも、優占種ではないものの、検出された。洗濯工程における付着細胞数の変動を調査した結果、洗濯前に比べて洗濯後に付着微生物細胞数の減少が観察され、その効果は洗剤を用いることで高められる傾向であった。一方、乾燥工程中ではわずかな細胞数の増加が外干し・部屋干しにかかわらず観察された。この結果は、現状の洗濯工程が綿布からの微生物細胞脱離に十分機能していないと判断され、綿布からの微生物細胞の効果的な脱離手法の開発が求められる。

biofilm, metagenome analysis, malodor

講演番号：3A02a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A02 会場

紀州なれずしの発酵過程における細菌叢の変遷とその要因
Analysis of bacterial biota in *Kishu saba-narezushi* during fermentation process
○土井 遼平[1]、奥村 真衣[2]、藤田 知佳子[2]、水野 洸介[2]、上原 葵[2]、野村 泉[1]、稲葉 桂子[1]、島田 昌也[1]、鈴木 徹[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大院自然科学、[2]岐阜大応生)
○Ryohei DOI[1], Mai OKUMURA[2], Tikako FUJITA[2], Kosuke MIZUNO[2], Aoi UEHARA[2], Izumi NOMURA[1], Keiko INABA[1], Masaya SHIMADA[1], Tohru SUZUKI[1], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Div. of Natural Sci Technol, Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【目的】
紀州なれずしは現在でも親しまれている和歌山県の郷土料理の一つである。紀州なれずしは、数ヶ月塩漬けにしたサバを水につけ数日かけて塩抜きした後、塩飯の上に乗せ、全体をアセの葉で包み、隙間なく木桶に敷き詰め、重しをして出来るだけ嫌気な状態に近づけ数日から数週間つけ込み、自然発酵させる伝統的な発酵食品である。これまで、日本の様々なれずしの発酵過程における菌叢などが解析されてきたが、和歌山県日高地方の紀州なれずしに関する詳細な報告例はほとんどない。
そこで、本研究では和歌山県日高地方の紀州なれずしの発酵過程における菌叢変遷の解析と細菌叢変遷の要因について追究した。
【結果・考察】
2015 年の紀州なれずし（発酵 5 日目：pH 3.93±0.08）の細菌叢について 16S rRNA アンプリコン解析を行ったところ、89.1%が *Lactobacillus* 属であり、その主要な乳酸菌種は *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* であった。そこで、発酵過程の細菌叢の変遷をモニタリングするため、2016 年には発酵 0、2、5 日目のサンプルについて観察した。各サンプルの米飯部 pH は 0、2、5 日目においてそれぞれ 5.08±0.28、4.75±0.06、4.19±0.08 と、5 日目に大きく低下した。一方、その菌叢は発酵が進むにつれて *Lactococcus* 属などの乳酸菌が増加し、2 日目には全体の 50%近く、5 日目には約 90%が乳酸菌で占められた。また、5 日目には *Lactobacillus* 属が増加した。よってなれずしの pH 低下には *Lactobacillus* 属が大きく関与していることが考えられる。一方、2016 年のなれずしでは 5 日目でも主要乳酸菌は *Lc. lactis* subsp. *lactis* であり、2015 年度のように *Lb. plantarum* への完全な菌叢変化は見られなかった。これらのことから、2015 年のなれずしの方が 2016 年サンプルよりもより発酵が進んでいると推測された。そこで、私達はなれずしの発酵過程における *Lactococcus* 属から *Lactobacillus* 属への変遷の要因として pH と酸素環境を考え、両乳酸菌の生育に与える影響を観察した。MRS 培地において *Lc. lactis* と *Lb. plantarum* の生育を pH と酸素条件を変更して比較したところ、pH 条件の変更では生育に特徴ある違いは現れなかったが、*Lc. lactis* は好気と嫌気両条件下で良好な生育示すものの、*Lb. plantarum* は嫌気条件に比べ好気生育が著しく遅かった。これらの結果から、なれずしの細菌叢は発酵開始直後 *Lactococcus* 属が優先的に増えることで酸素を消費し、その後、*Lactobacillus* 属が優占種へと変遷することで pH が急激に低下していくものと予測される。

Kishu saba-narezushi, lactic acid bacteria, bacterial biota

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A02a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A02 会場

伝統的純米壺造り黒酢醸造における熟成期の網羅的解析

Studies on the aging step in traditional pot fermentation of rice vinegar

○渡辺 紳太[1]、青柳 智[2]、堀 知行[2]、藤井 曉[3]、長野 正信[3]、亀谷 将史[1]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院農、[2]産総研　環境管理研究部門、[3]坂元醸造株式会社)
○Shinta WATANABE[1], Tomo AOYAGI[2], Tomoyuki HORI[2], Akira FUJII[3], Masanobu NAGANO[3], Masafumi KAMEYA[1], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Tokyo Univ., [2]AIST EMtech, [3]Sakamoto brewery)

【目的】蒸し米と麹と地下水のみを材料とし、その後の人為的な微生物の添加を伴わず壺内の様々な微生物によって糖化や種々の発酵が進行する壺造り純米黒酢（坂元醸造）において、発酵中の菌叢の変遷について知見を深めることは大変意義深い。黒酢醸造においては、熟成のために「壺寄せ」を行う。即ち、4 つの壺内の発酵液を 3 つの別の壺にまとめ、その後屋外で熟成の過程に入る。この壺寄せ後の熟成過程は黒酢の品質に大きな影響を与えるが、その菌叢変化および微生物の与える影響に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、次世代シークエンサーによる菌叢解析や化学成分分析、DNA 濃度を指標とした菌体数推移の測定を行い、未知の熟成期菌叢や微生物の引き起こす作用についてその全容を知ることを目的とした。
【方法】熟成期における壺寄せ直後から壺寄せ後およそ 300 日の、液面下 20 cm について 13 区画、液面下 30 cm について 3 区画×3 連の発酵液サンプルに対し、発酵液内微生物の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく次世代シークエンサーを用いた菌叢解析を行った。また HPLC による酢酸、乳酸定量や、DNA 定量に基づく熟成期の菌体数変遷解析を行った。
【結果と考察】菌叢解析の結果から、熟成初期において最も大きな存在比率を占めるのは Firmicutes 門であり、その中でも特に *Lactobacillus acetotolerance* が最も優占的に存在していることが示された。一方で菌叢全体における *L. acetotolerance* の存在比は熟成後期に低下し、代わりに酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* と *Komagataeibacter xylinus* の存在比率が上昇していることが示され、この結果は過去の知見と矛盾がなかった。酢酸菌については、主要酢酸菌 *A. pasteurianus* と *K. xylinus* が熟成後期において異なる挙動を示すことが示唆された。菌体数変遷解析では、熟成期の菌体数は初期に多く、後期には菌体数は少ないことが明らかとなった。更に液面下 30 cm の菌叢解析により、熟成後期において乳酸菌が下部に局在する可能性が示唆された。
成分分析の結果では、熟成期において酢酸や乳酸の濃度は大きな変化がないことが示され、一般的に酢酸菌は酢酸過酸化を引き起こし、食酢醸造においては品質低下を引き起こすが、本黒酢醸造の熟成期に顕著な過酸化は進行していないことが示唆された。このことは、熟成期後期の菌叢において酢酸菌が優占的であることを踏まえると非常に興味深い結果であった。

microbial flora, fermentation, acetic acid

講演番号：3A02a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A02 会場

活性汚泥における微生物捕食作用の機構解明と捕食促進による汚泥減容効果

Predator-prey interactions in a complex activated sludge microbiome and its application for sludge reduction

○佐藤 由也、稲葉 知大、堀 知行、羽部 浩（産総研環境管理）
○Yuya SATO, Tomohiro INABA, Tomoyuki HORI, Hiroshi HABE (AIST)

【背景・目的】現在、国内の産業廃棄物の実に 20%を微生物廃棄物が占めている。これは、下水処理場から排出される大量の余剰活性汚泥に起因する。我々の生活排水は活性汚泥と呼ばれる、数千種以上からなる複雑な微生物群集によって処理されるが、増えすぎた微生物（余剰汚泥）は産業廃棄物となり、その処理にかかる膨大なコストが重大な課題となっている。これまでにも、主に物理化学的な手法を中心に様々な余剰汚泥減容化技術が開発されてきたが、我々は活性汚泥中で微生物同士の捕食が活発に生じることを見出し、これを汚泥減容に応用することを提案している。しかし複雑な活性汚泥で生じる捕食現象は多くの部分が未解明であるため、本研究では、メタトランスクリプトーム等の網羅解析を用いそのメカニズムを解明し、得られた知見に基づき捕食作用の促進を試みた。

【結果・考察】栄養源（人工下水）を加えずに活性汚泥を 12 日間培養したところ、活性汚泥濃度は徐々に減少し、捕食作用が活性化していることが示唆された。そこで、系内で活性化している代謝系を明らかにするためにメタトランスクリプトーム解析を行った。初めに rRNA 発現量に着目したところ、全体に占める真核生物の割合が 14%から 37%にまで増加し、貧栄養条件で原生・後生動物が高活性であることが示された。次に mRNA に着目すると、捕食性細菌由来のタンパク質分解酵素、アミノ酸代謝系酵素、脂肪酸代謝酵素の遺伝子群が高発現していた。このことから、捕食性細菌は貧栄養条件においては細胞残渣である高分子タンパク質や脂肪酸化合物を原料として利用し、アミノ酸と脂肪酸を起点として TCA 回路等の中央代謝系を駆動する、つまり少ない栄養源を巧みに使い生存していることが示された。しかし、真核生物の mRNA は多くが機能未知であり、代謝的特徴の解明には至らなかった。そこで顕微鏡観察により真核生物の捕食様式を観察したところ、多くの原生・後生動物は標的微生物群に接触するプロセスを経て捕食を開始することを見出した。これらの結果を踏まえ、真核生物による捕食作用を促進することを目指し、汚泥の沈殿・接触工程を加えて汚泥減容化実験を行ったところ、沈殿工程がない系と比べて 6~10%ほど減容化効率が上昇することがわかった。一方、捕食性細菌の寄与率を調べるために抗生物質を加えて同様の試験を行ったところ、汚泥の減容効率が著しく低下することがわかった。このことから、捕食以外の作用も含め、細菌による代謝活動が汚泥の減容化に大きく寄与していることが示唆された。本成果は、これまでブラックボックスであった活性汚泥における捕食機構の一端を網羅解析により明らかにし、その汚泥減容化技術への応用に資する重要な知見を提供するものである。

microbial predator, activated sludge, metatranscriptome analysis

講演番号：3A02a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A02 会場

土壌由来難培養性細菌の単離及び易培養性細菌との共存関係

Isolation of not-yet-culturable bacteria and co-culture with culturable bacteria

○高橋 紳八[1]、加藤 広海[1]、永田 裕二[1]、大塚 重人[2]、大坪 嘉行[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大院生命、[2]東大院農生命)
○Shinya TAKAHASHI[1], Hiromi KATO[1], Yuji NAGATA[1], Shigeto OTSUKA[2], Yoshiyuki OTSUBO[1], Masataka TSUDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Univ.)

土壌中には 1 g あたり 10 の 9 乗以上の細菌が棲息しているが、この中で容易に培養可能な細菌は 1%にも満たないとされている。そのため土壌には未開拓の遺伝資源が多く眠っており、それらを得るために難培養性微生物の培養法の確立が求められている。我々はこれまでに、土壌から抽出した細菌叢を滅菌土壌に接種して細菌叢が再構成されているプロセスを、次世代シーケンサーによる長期間の菌叢モニタリングで明らかにしてきた。接種後の初期に増える細菌群とそれに続いて増える細菌群に一定の傾向が見られたことから、難培養性細菌が多く含まれる後期に増殖する細菌群の生育には、前期に増殖する細菌群の存在が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで本研究では細菌間の相互作用に着目し、前期増殖グループの *Burkholderia* 属細菌株と共培養することによる難培養性細菌株の分離を目的とした。

Burkholderia 属細菌株の培養由来成分を含む無機塩固体培地に土壌懸濁液を接種し、長期間培養した結果、*Burkholderia* 属由来成分を含む培地で良好かつ安定的に生育する細菌株を複数取得した。その 16S rRNA 遺伝子の解析により、分離株には *Firmicutes* 門や *Actinobacteria* 門などの様々な細菌群が存在したが、培養例が極めて少ないグループである *Verrucomicrobia* 門の細菌株も含まれていた。この新規性の高い *Verrucomicrobia* 門細菌株は、上記の滅菌土壌で再構成された細菌叢において、優占したグループと近縁であった。一方、当該 *Verrucomicrobia* 門細菌株は滅菌土壌に単独で接種した場合はその菌密度を維持できなかったが、*Burkholderia* 属細菌株と共培養することで増殖が可能になった。従って、このような共培養系は、土壌環境で細菌間ネットワークが形成されていく過程におけるひとつのモデルケースと捉えることできる。現在は両細菌株の共存メカニズムの解析を進めている。

Not-yet-culturable bacteria, Soil, Co-culture

講演番号：3A02a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A02 会場

環境汚染物質の分解細菌コミュニティにおける非分解菌コロニーの分解菌コロニーへの接近現象
Directional growth of colonies of a non-degrading bacterium towards colonies of a γ-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium
○加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二 (東北大院生命)
○Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

実環境における汚染浄化では，汚染化合物の分解細菌は単一カルチャーではなく他の細菌と関わり合いながらコミュニティとして働くと予想されるが，分解菌と他者である土着菌との間にどのようなコミュニティが形成され得るかに関してはほとんど情報がない。我々は、難分解性汚染物質の一つでもある有機塩素系殺虫剤γ-HCH（hexachlorocyclohexane）の分解コミュニティにおける分解菌 *Sphingobium* sp. TKS 株と非分解菌との関係性について追求してきた。これまでの研究より，個体培地において非分解菌 *Cupriavidus* sp. TKC 株のコロニーは TKS 株のコロニーに向かって伸長成長することが明らかとなった．そこで本研究ではこのコロニー接近現象を，非分解菌が積極的に分解菌とコミュニティを形成する一つのモデルケースと捉え，本現象を司るメカニズムの解明を目的とした．

TKC 株コロニーが自身以外のコロニーへと接近する現象について，対象株として分解菌 TKS 以外の株を用いて検証した．その結果，系統的に異なる 8 株の sphingomonads の全てに対してコロニー接近が観察された．一方で，*E. coli* や *Pseudomonas* のコロニーに対しては接近が確認できなかった．これらの結果は,TKC 株のコロニー接近が,γ-HCH 分解菌 TKS 株に特異的な現象ではなく,sphingomonads に対して広く見られる現象であることを示唆している．また，個体培地に界面活性剤を滴下すると似た現象を誘発できることから，コロニー接近の何らかのステップにおいて界面活性剤が関与している可能が示された．

またγ-HCH 分解コミュニティの安定性を液体培養についても調べた．HCH を唯一の炭素源とした培地で計 5 回の継代培養を行った結果，HCH 分解速度は 3 倍程度上昇した．一方で，希釈継代後の HCH 分解に伴って CFU が 100 倍ほど増加するものの，非分解菌の割合が減少することはなく，分解菌と同程度もしくは 10 倍ほど高い CFU を示すことがわかった．従って，分解コミュニティにとって非分解の存在が何らかのアドバンテージを有するものと思われる．

γ-hexachlorocyclohexane, community, colony

講演番号：3A02a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A02 会場

難分解性芳香族化合物分解コンソーシアム由来の分解細菌 *Mycobacteirum* sp. EPa45 株における生育阻害機構

The mechanism of growth inhibition in degrading *Mycobacterium* strain from a consortium degrading persistent aromatic hydrocarbons.

○小川 なつみ、加藤 広海、岸田 康平、市橋 永吉、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大院生命）
○Natsumi OGAWA, Hiromi KATO, Kouhei KISHIDA, Eikichi ICHIHASHI, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

環境浄化に対するバイオレメディエーションの有効利用のために、様々な汚染物質分解細菌株が単離され、分解メカニズムが解明されてきた。一方これら菌株の単離過程で、複数種が共在する複合微生物系（コンソーシアム）がしばしば得られていた。多くの研究において、細菌がコンソーシアムを形成することは、特定の機能の安定的かつ効率的な発揮に重要であることが示唆されているものの、その共在メカニズムが解明された例は限られている。コンソーシアムにおける共在機構解明のため、我々は芳香族化合物汚染土壌から取得したフェナントレン分解能を有するコンソーシアム（MixEPa4）の解析を行ってきた。MixEPa4 から単離したフェナントレン分解細菌 *Mycobacteirum* sp. EPa45 株はフェナントレン含有最小固体培地で生育阻害を受けるが、コンソーシアム由来の非分解細菌 *Burkholderia* sp. Bcrs1W 株と混合培養することで生育阻害が緩和される効果（SGI 効果: Suppression of Growth Inhibition）を見出した。本効果については、Bcrs1W 株のみならず、モデル土壌細菌 *B. multivorans* ATCC 17616 株や Keio collection 親株の *E. coli* BW25113 株でも示すこと、一定以上存在する非分解細菌の生細胞が重要であることが明らかとなっている（小川、農芸化学会 2017）。本研究では、更なる解明を目指し、遺伝学的な解析によって EPa45 株がフェナントレンで生育阻害を受ける要因を明らかにすることを目的とした。

EPa45 株はフェナントレンのみならず、その分解中間産物の 1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸（1H2NA）、そしてビフェニルやナフタレンに対する分解活性を有し、生育阻害を受けた。その一方で、ピレンやカルバゾールに対する分解活性は検出されず、生育阻害を受けなかった。従って、分解可能な多環芳香族化合物が EPa45 株の生育阻害に関与することが示唆された。また、フェナントレンやナフタレン、ビフェニルによる生育阻害は、当該化合物分解細菌 *M. vanbaalenii* PYR-1 株においても見出され、さらにこの２株の生育阻害は Bcrs1W 株や ATCC 17616 株との共在により緩和された。

次に 1H2NA の初発分解酵素をコードする *phdI* 破壊株を構築し、1H2NA に対する分解能および生育能を検討した。本破壊株の当該化合物に対する分解活性は検出されず、さらに当該化合物最小固体培地では野生株と比較して強く生育阻害を受けた。以上のことから EPa45 株は、分解可能な多環芳香族化合物そのものにより生育阻害を受けていると示唆された。

Microbial consortium, persistent aromatic hydrocarbons, growth inhibition

講演番号：3A02a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A02 会場

サンゴから単離した共在微生物による病原菌の生育抑制機能評価
Isolation of bacteria associated with the reef-building coral *Galaxea fascicularis* for protection of coral health against temperature-dependent pathogens

○三浦 夏子[1]、元根 啓佑[1,2]、高木 俊幸[2,3]、植田 充美[1]([1]京大院・農・応用生命、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]東大大気海洋研)
○Natsuko MIURA[1], Keisuke MOTONE[1,2], Toshiyuki TAKAGI[2,3], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]AORI, Univ. Tokyo)

【背景と目的】
サンゴ礁は、海洋面積に占める割合は 0.5%未満であるにも関わらず、全海洋生物の 30%が生息するなど、重要な生物・遺伝的資源の保存庫である。一方で近年の地球温暖化に伴い、高水温で病原活性が上昇するサンゴ病原体による被害が世界的に拡大しており、サンゴ礁の減少を加速させている。特に、*Vibrio coralliilyticus* は幅広いサンゴ種において温度依存的に強力な病原性を発揮するグラム陰性細菌であり、早急な対策が求められている。本研究では世界中に幅広く存在するサンゴの中でも、アザミサンゴ（*Galaxea fascicularis*）においては *V. coralliilyticus* による感染症状を発症しないという観察結果に着目して、仮説「アザミサンゴに共在する微生物が *V. coralliilyticus* の生育抑制に働く」を設定し、その検証を試みた。

【方法と結果】
まずアザミサンゴから共在微生物の単離・培養を行った。粘液及び組織を回収し、Marine Agar plate を用いて共在微生物からなるコロニーを生育させた。組織中・粘液中から単離したコロニーそれぞれからゲノムを抽出し、16S rRNA 遺伝子の増幅・シーケンスを行ったところ、それぞれ 28、11 のコロニーを得た。これらのコロニーの解析の結果、*V. coralliilyticus* をはじめとする既知の微生物に対してそれぞれ相同性 98%以上の一致が見られた。アザミサンゴから単離した *V. coralliilyticus* は、単離・培養条件下では高い生育活性と抗生剤耐性を示した。さらに、16S rRNA メタゲノム解析による細菌叢解析でもビブリオ属を含む細菌の存在が示唆されたことから、アザミサンゴには *V. coralliilyticus* が共在するものの、致命的な病態の発揮には至っていないことが示唆された。そこで、アザミサンゴから単離した共在微生物群について、*in vitro* での阻止帯決定法により *V. coralliilyticus* の生育を抑制する微生物のスクリーニングを検討したので、結果をまとめて報告する[1]。

[1]Miura et al. submitted.

Coral, Vibrio coralliilyticus, Symbiotic bacteria

講演番号：3A02a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A02 会場

サンゴ共生褐虫藻の単離・培養条件の検討

Isolation and cultivation of coral symbiotic algae

○元根 啓佑[1,2]、三浦 夏子[1]、高木 俊幸[2,3]、青木 航[1]、植田 充美[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]日本学術振興会、[3]東大・大気海洋研）
○Keisuke MOTONE[1,2], Natsuko MIURA[1], Toshiyuki TAKAGI[2,3], Wataru AOKI[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]AORI, Univ. Tokyo)

【背景・目的】
サンゴ礁は全海洋生物種の約 25%が生息する地球上で最も生物多様性の豊かな地域の一つである。サンゴ礁を構成するサンゴは、その細胞内に光合成を行う褐虫藻（*Symbiodinium*）と呼ばれる微細藻類（渦鞭毛藻）を共生させている。しかし近年、地球温暖化に伴う海水温上昇などの影響でサンゴと褐虫藻の共生関係が崩壊し、サンゴが褐虫藻を失うことで白くなる「白化現象」が頻繁に観測されるようになってきている[1]。褐虫藻はサンゴが必要とする栄養の約 90%を供給しているため、白化したサンゴは栄養不足に陥り、やがて死に至る。このように、褐虫藻はサンゴという動物細胞の恒常性（ホメオスタシス）を考える上で非常に重要な存在であるが、褐虫藻をサンゴから単離・培養することは容易ではなく、褐虫藻に対する理解はあまり進んでいない。そのため本研究では、サンゴに共生する褐虫藻の単離に向けて適切な培養条件を検討することを目的とした。

【方法・結果】
世界中の海域に広く存在する造礁サンゴであるアザミサンゴ（*Galaxea fascicularis*）から褐虫藻の単離を試みた。アザミサンゴの組織を回収し、その懸濁液を微細藻類用の培地で培養したところ、球形の細胞の増殖が確認された。次に、この細胞から DNA を回収し、褐虫藻の 18S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行ったところ、増幅産物が確認されたことから、増殖している細胞は褐虫藻であることが示された。種々の条件における褐虫藻の生育速度も測定したので、まとめて報告する[2]。

[1] Motone et al., submitted
[2] Motone et al., submitted

coral, *Symbiodinium*, symbiosis

発表責任者：植田　充美（miueda@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A02a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A02 会場

エレメンタル土壌微生物接種による非土壌媒体の土壌化
Artificial soil creation from soilless media by inoculation of elemental soil microorganisms
○篠原 信[1]、吉田 賢啓[2]、岡田 若子[3]、宇佐美 晶子[3]、サクンタラ サイジャイ[3]、安藤 晃規[3,4]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、小川 順[3,4]、高野 雅夫[2] ([1]農研機構、[2]名古屋大学、[3]京大院農・応用生命、[4]京大・生理化学、[5]慶大・理工、[6]富山県立大工・生工研セ)
○Makoto Shinohara[1], Masahiro Yoshida[2], Wakako Okada[3], Shoko Usami[3], Saijai Sakuntala[3], Akinori Ando[3,4], Kenji Miyamoto[5], Yasuo Kato[6], Jun Ogawa[3,4], Masao Takano[2] ([1]NARO, [2]Nagoya Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [6]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】有機物を分解し植物に好適な無機養分を供給する機能（土壌機能）はこれまで、自然土壌のみがなし得る機能であった。有機質肥料活用型養液栽培ははじめて、土壌以外の媒体で有機物の無機養分化を果たした技術だが、微生物源に自然土壌を用いるため、微生物種は 1 万種類以上となり、それぞれの微生物の果たす役割を解析することは困難であった。我々は、従属栄養細菌 1 菌株、アンモニア酸化菌 1 菌株、亜硝酸酸化菌 1 菌株の計 3 種の微生物のみで土壌機能の再現に成功した。そこで本研究では、これら最小限の土壌微生物（エレメンタル土壌微生物）を用いて、非土壌の土壌化（土壌機能の付与）を試みた。

【方法・結果】エレメンタル土壌微生物として選抜された微生物 *Bacillus badius* をアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌と組み合わせ、共培養した。Peptone, Yeast extract など、様々な有機物の液体培地を作成し、エレメンタル土壌微生物を培養したところ、いずれも有機態窒素は硝酸態窒素に変換され、様々な有機物の無機養分化が可能であることが示された。非土壌媒体としてロックウールを用い、エレメンタル土壌微生物を接種し、有機物を添加したところ、媒体内での硝化が確認され、土壌機能の再現ができたことが示された。この媒体にコマツナ種子を供したところ、有機物と水を随時添加することで、順調に生育した。この結果から、エレメンタル土壌微生物による土壌化が可能であることが明らかとなった。

organic hydroponics, nitrification, soil creation

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3A02a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A02 会場

高濃度の亜硝酸を酸化しうる硝化菌の単離と諸性質の解析
Isolation and characterization of a nitrifying bacterium for oxidation of high concentration nitrite
○岡田 若子[1]、安藤 晃規[1,2]、宇佐美 晶子[1]、Sakuntala Saijai[1]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]、篠原 信[5]、小川 順[1,2]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]慶大・理工、[4]富山県立大工・生工研セ、[5]農研機構)
○Wakako OKADA[1], Akinori ANDO[1,2], Shoko USAMI[1], Saijai SAKUNTALA[1], Kenji MIYAMOTO[3], Yasuo KATO[4], Makoto SHINOHARA[5], Jun OGAWA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]NARO)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は、通気下で有機態窒素の硝化に有用な微生物群を馴養する工程と、引き続く植物栽培工程で構成される。我々はこれまでに微生物源として硝化能に優れた土壌を選抜し、数回硝化を繰り返し馴養した硝化微生物群集が有機質肥料活用型養液栽培に有用であることを報告した。今後、実用化に向け、安全性の向上や、多様な有機物分解能の付与など、種々の条件に応じた硝化微生物群のデザインが求められる。本研究では、硝化微生物群集の人工的再構築を目指し、硝化微生物群集を高濃度亜硝酸条件下にて集積することによる亜硝酸酸化菌の取得を試みた。
【方法・結果】硝化菌群を馴養する工程に亜硝酸ナトリウム（5 g/L）を添加し、亜硝酸酸化菌群の集積培養を行った。集積した微生物群を、2% ゲランガム培地（Na_2HPO_4・$2H_2O$, 3.2 g/L; KH_2PO_4, 0.272 g/L; $FeSO_4$・$7H_2O$, 1 mg/L; $MgSO_4$・$7H_2O$, 10 mg/L; $NaNO_2$, 5 g/L）に播種し、コロニーを形成させた。さらに亜硝酸酸化酵素遺伝子の PCR での増幅が確認できたコロニーを対象に、上記と同様の組成の液体培地にて亜硝酸酸化活性を示すコロニーを選抜した結果、培養 7 日間で 1500 ppm の亜硝酸イオンの完全酸化を示した。このコロニーを対象に 16SrDNA の簡易解析を行ったところ脱窒菌である *Alicycliphilus* sp. と亜硝酸酸化菌である *Nitrobacter* sp. が共存したコロニーであることが判明した。さらに、培養時に抗生物質、ならびに、代謝物アナログ等を活用することで *Nitrobacter* sp. の単離に成功した。現在、生理学的諸性質の解析を行っている。

organic hydroponics, nitrite-oxidizing bacteria, nitrification

講演番号：3A02a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A02 会場

Comparative study of nitrification-promoting factors in designed microbial consortia

○Richard Metzner[1], Naoki Kitaoka[1], Taiji Nomura[1], Kenji Miyamoto[2], Makoto Shinohara[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5], Yasuo Kato[1] ([1]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]NARO, [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【Introduction】 Nitrifying bacteria play an important role in the global nitrogen cycle, oxidizing ammonia (NH_3) to nitrate (NO_3^-) via nitrite (NO_2^-). Differential analysis of single strain cultures of nitrifying bacteria can give more insights into factors for optimal nitrification efficiency. In this study, we examined the effects of (i) trace metals, (ii) organic nutrient and (iii) physical contact in a recently established three-strain system[1] in which organic nutrients are first degraded into NH_3 by the heterotroph *Bacillus badius* (*Bb*). NH_3 is oxidized *in situ* to NO_2^- by *Nitrosomonas europaea* (*Ne*) and further oxidized to NO_3^- by *Nitrobacter winogradskyi* (*Nw*), thus generating a nitrification model.

【Methods / Results】 Nitrification activity in single cultures of *Ne* and *Nw* was analyzed via colorimetric determination (Griess assay) of NO_2^- formation in NBRC 829 medium (19 mM NH_4^+) and NO_2^- consumption in inorganic medium (28 mM NO_2^-), respectively. (i) MoO_4^{2-} and Zn^{2+} promoted NO_2^- oxidation activity by *Nw*, but also exhibited antagonism in the presence of each other. Co^{2+} and Cu^{2+} significantly inhibited NO_2^- oxidation in the absence of MoO_4^{2-} or Zn^{2+}. On the other hand, when *Ne* was supplemented with trace metals, either separated or in a mixture, none of them acted as inhibitors, but Co^{2+} promoted NH_3 oxidation. This is intriguing as Co^{2+} thus holds a hitherto unknown ambivalent role in nitrification and might be considered as an important regulator of the nitrification efficiency in such systems. (ii) Organic nutrient media that are used in the three-strain system were added to *Nw* cultures either directly or after pretreatment with *Bb*, i.e. after cultivation for several days followed by sterile filtration. Both solutions stimulated NO_2^- oxidation by *Nw*, suggesting the presence of growth-promoting chemical compounds or trace metal chelators in the medium. (iii) Physical contact with *Ne* resulted in diminished NO_2^- oxidation activity of *Nw*, since this effect was not observed when both strains were separated via a nitrocellulose membrane, preventing physical interaction while allowing the diffusion of chemical compounds, ions and gases. The effects of physical contact with the heterotroph *Bb* on the nitrifying ability of *Ne* and *Nw* are currently under way.

[1] S. Saijai *et al.,* JSBBA Conference in Kyoto 2017.3.17-20 (oral).

nitrification, trace metal antagonism, co-culture

発表責任者：加藤　康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3A02a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A02 会場

糸状菌と枯草菌の相互作用の解析

Analysis of interactions between *Aspergillus nidulans* and *Bacillus subtilis*

○久知良 桃花、尾花 望、野村 暢彦、竹下 典男（筑波大生命環境）
○ Momoka KUCHIRA, Nozomu OBANA, Nobuhiko NOMURA, Norio TAKESHITA (Univ. Tsukuba)

健康・食糧・環境に深く関わっている微生物複合体の理解と制御のため、同種・異種の微生物間の相互作用についての研究が注目を集めている。細菌間の相互作用では、クオラムセンシングやバイオフィルム形成についての分子レベルでの知見が蓄積してきている。環境中の主要な微生物であるカビと細菌が相互作用していると考えるのは自然であるにもかかわらず、それらの相互作用に関する知見は、極めて限定的である。そこで、本研究では、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* とグラム陽性細菌のモデル生物である *Bacillus subtilis* との相互作用に焦点を当てる。

両者を共培養することにより、それぞれの生育様式・相互作用・バイオフィルム形成・遺伝子発現に与える影響について解析を行った。糸状菌用の液体最少培地に *A. nidulans* の胞子を植菌し、胞子が発芽し菌糸生長が始まる約 7 時間後に、OD_{600} が 0.01 になるように *B. subtilis* を植菌し、24 時間に渡り、菌糸の生長速度と *B. subtilis* の増殖を測定した。それぞれの単独培養と共培養の結果を比較することで、この条件では共培養が他方の生育に大きな影響を与えないことが分かった。固体培地上で共培養を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ、*B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って運動する様子が観察された。また、*A. nidulans* の菌糸の伸長に伴って、*B. subtilis* が菌糸上を移動し生育空間を拡大していることが明らかとなった。*B. subtilis* のべん毛を欠損させた株を用いて同様の実験を行なったところ、*B. subtilis* の菌糸上での移動や生育空間の拡大は観察されなかった。

これらのことから枯草菌が糸状菌の菌糸を足場にして移動し増殖すること、そして枯草菌のべん毛がその相互作用に関わることが示唆された。現在は、相互作用の物理的または化学的性質について、解析を行なっている。また、異なる菌の組み合わせを用いることで、相互作用の普遍性と特異性についての解析を行っている。

Aspergillus nidulans, *Bacillus subtilis*, interaction

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A02p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A02 会場

電子線トモグラフィー法で観察した酢酸菌のセルロースリボン構造
Structure of cellulose ribbon from *Gluconoacetobacter xylinus* revealed by electron tomography
○中井 朋則[1]、村田 和義[2]、山内 大輔[1]、峰雪 芳宣[1] ([1]兵庫県大生命理、[2]生理学研究所)
○Tomonori NAKAI[1], Kazuyoshi MURATA[2], Daisuke YAMAUCHI[1], Yoshinobu MINEYUKI[1] ([1]Univ. Hyogo, [2]NIPS)

酢酸菌（*Gluconacetobacter xylinus*）の合成するセルロース繊維は、細胞膜から排出された 1.5 nm サブエレメンタリーフィブリルが集合して 3.5 nm エレメンタリーフィブリルを形成し、それらが密着して 6-7 nm のセルロースフィブリルが形成され、そのセルロースフィブリルがさらに集まって最終的にねじれたセルロースリボンへ束化していくと考えられている。今回、より詳細に酢酸菌の合成するセルロース繊維の構造や種類をより詳細に調べるため、電子線トモグラフィー法を用いて、3 次元的にセルロース繊維のモデル化を試みた。特に、菌体に近い部分で排出されているセルロース繊維をモデル化することで、セルロースリボン形成段階のセルロース繊維が検出できると考えた。メッシュ上で培養した酢酸菌を急速凍結により氷包埋し、セルロースを合成している酢酸菌をクライオ透過型電子顕微鏡（JEM-2200FS）で観察した。セルロース繊維についての連続傾斜画像を得て、この傾斜画像から電子線トモグラムを作成した。トモグラムに含まれるセルロース繊維の断面の輪郭をトレースすることでセルロース繊維のモデル化を行い、その形状を調べた。セルロース繊維の境界面は、トモグラムの XY 平面像とその断面像を比較しながら確認した。比較的太い繊維では、多数のリボンやフィブリルから形成されているように見えたが、構造が複雑であるため、より細く見えるセルロース繊維について電子線トモグラムを作成し、セルロース繊維のモデル化を行った。その結果、セルロース繊維は複数のセルロースリボンが密接して存在していることが明らかとなった。また、セルロースリボンからセルロースフィブリルが分離したり、集合したりすることを繰り返しており、リボン同士が密接に存在できる原因であると考えられた。また、菌体から排出された直後と考えられるセルロース繊維を含む電子線トモグラムからモデル化したセルロース繊維でも比較的早い段階でリボンを形成しており、そのリボンがさらに成長してより太いリボンが形成されていくと考えられた。

cellulose ribbon, electron tomography, *Gluconacetobacter*

講演番号：3A02p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A02 会場

アクチノロージンと結合する放線菌由来分泌タンパク質
A secreted protein that binds to Actinorhodin
○西山 辰也[1]、橋本 義輝[2]、髙野 英晃[1]、熊野 匠人[2]、小林 達彦[2]、上田 賢志[1] ([1]日大生資科、[2]筑波大院・生命環境)
○Tatsuya NISHIYAMA[1], Yoshiteru HASHIMOTO[2], Hideaki TAKANO[1], Takuto KUMANO[2], Michihiko KOBAYASHI[2], Kenji UEDA[1] ([1]College of Bioresource Sci., Nihon Univ., [2]Grad. School of Life and Environm. Sci., Unive. of Tsukuba)

【背景・目的】
我々は新奇酸化酵素のスクリーニングの過程で、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の培養上清に L-アスコルビン酸および L-システインに対する酸化活性があることを発見した。そして、本触媒活性は酵素によるものではなく、本菌が分泌する二次代謝産物であるアクチノロージン(ACT)によることを見いだし、ACT が有機触媒（触媒活性を有する金属非含有の低分子有機化合物）であることを証明した。更に、その証明過程において、培養上清中で ACT とタンパク質が相互作用する可能性を見いだした。自身の生産する二次代謝産物と細胞外で相互作用するタンパク質の例は他にない。そこで、その機能と役割を解明することを目的とした検証を行った。
【方法】
各種クロマトグラフィーと ACT の吸光を指標に ACT と相互作用するタンパク質の精製を行った。精製されたタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティングにより同定したところ ACT 生合成クラスター中に存在するタンパク質であることが判明した。また、このタンパク質のアミノ酸配列には細胞外に分泌されるタンパク質が持つシグナル配列が存在していることから、本タンパク質は細胞外に分泌され、細胞外で ACT と複合体を形成している可能性が示唆された。そこで先ずは ACT と本タンパク質の相互作用を証明するため、超遠心分析法や表面プラズモン共鳴法を用いた生体分子間相互作用試験を行った。また同時に、相同組換えを利用した手法により ACT 結合タンパク質をコードする遺伝子の破壊株の取得を試みた。
【結果】
本タンパク質とACTとの相互作用を検証すべく、超遠心分析によるACTとの結合を調べた。野生株から精製したタンパク質溶液を試料とし、ACTの極大吸収波長で沈降係数を測定すると、その値はタンパク質の分子量と同程度の値を示した。すなわち、ACTは本来の分子量(MW=634)とは異なり高分子側に検出されたことから、ACTが本タンパク質と結合していることが示された。また表面プラズモン共鳴法でも同様の結果を得ることが出来た。相同組換えを利用して本タンパク質の遺伝子破壊株を取得し、その形質を観察したところ野生株と比較してACTの生産が確認されたものの、その生産量は減少していることが判明した。

actinorhodin, organocatalysts

発表責任者：西山　辰也（nishiyama.tatsuya@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A02p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A02 会場

anammox 菌による外来ヒドラジンの代謝
Metabolism of exogenous hydrazine in an anammox bacterium.
○西山 孝[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1] ([1]崇城大・応生命、[2]熊大院・自然科学)
○Takashi NISHIYAMA[1], Kenji FURUKAWA[2], Takao FUJII[1] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech. Kumamoto Univ.)

【背景】ヒドラジン（N_2H_4）は、強力な還元剤で生物に対する変異原性や毒性を示す。嫌気性アンモニア酸化（anammox）を行う細菌は、菌体内で代謝中間体として N_2H_4 を生合成し、N_2H_4 の N_2 ガスへの酸化を触媒する酵素群を持っている。また、anammox 菌が培地に N_2H_4 を排泄し、再び培地から N_2H_4 が消失する報告がある。そこで我々は、培地に N_2H_4 を人為的に添加した場合でも、これを代謝できると予想した。本研究では、この代謝の有無を確認し、そのメカニズムを推定した。
【方法】まず、代謝の有無とそれに伴う化学量論を明らかにするため、anammox 汚泥を充填した上向流リアクタに、N_2H_4 含有培地を供給し、流入水と流出水に含まれる窒素成分の濃度と生成 N_2 ガス量を測定した。
　また、分子機構を推定するため、N_2H_4 添加時に発現が誘導・抑制される窒素化合物の代謝に関わる酵素の遺伝子を調べた。これには上述の N_2H_4 含有培地で運転した汚泥と通常の anammox 培地で運転した汚泥を用い、それらからそれぞれ調製した cDNA を使用して定量的 PCR で anammox および硝酸還元に関連する遺伝子の発現量を測定し、発現量を比較した。
【結果と考察】窒素成分として N_2H_4 と NO_3^-を含む培地で、安定した N_2H_4 除去と N_2 ガス発生が見られた。この時、培地には添加していないにも関わらず、流出水に NH_4^+が検出された。この際に消費・生成された窒素成分の化学量論は、$2N_2H_4 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow 2N_2 + NH_4^+ + 3H_2O$ となった。
　この N_2H_4 添加時の汚泥では、通常の anammox 培地の汚泥と比べ、N_2H_4 を酸化脱窒する HZO 遺伝子だけでなく、NH_4^+と NO から還元的に N_2H_4 を合成する HZS 遺伝子の発現量も増加していた。このことから、N_2H_4 添加時にも anammox 菌の代謝系が働いていると考えられた。また、NO_3^-を NO_2^-に還元する硝酸還元酵素の遺伝子発現量は両培地で違いはなかったが、NO_2^-から NH_4^+を生成すると予想した亜硝酸還元酵素の遺伝子の発現が N_2H_4 培地で抑制されていた。本来、電子受容体存在下で N_2H_4 を酸化し N_2 生成を触媒する HZO が、電子受容体非存在下で N_2H_4 を不均化し、NH_4^+を生じる反応を触媒することが分かっている。そのため、N_2H_4 添加時のように N_2H_4 が余剰となる条件では、不均化が起きたと思われた。
これらのことから、人為添加 N_2H_4 の処理では、anammox 菌による N_2H_4 の合成、N_2H_4 の酸化、N_2H_4 の不均化、NO_3^-の NO_2^-と NO への還元が起きており、これらが N_2H_4 の代謝を構成していると推定した。

anammox, hydrazine

発表責任者：西山孝（nisiyama@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：3A02p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A02 会場

F 因子による R388 の接合伝達増強

Enhancement of conjugative transfer of R388 by F factor

○恩田 翔輝、横井 崇紘、片岡 正和（信州大）
○Shoki ONDA, Takahiro YOKOI, Masakazu KATAOKA (Shinshu Univ.)

【背景と目的】

細菌の遺伝的多様性獲得機構の主たる機構として接合伝達が挙げられる。現在まで大腸菌をはじめ、多くのグラム陰性菌、グラム陽性菌で接合伝達が確認されてきた。特に大腸菌から同定された F 因子は大腸菌遺伝学の発展に大きく貢献し、分子生物学研究を推進してきた。F 因子における接合伝達は宿主選択域が狭く、その対象は大腸菌と一部の細菌に限定される。一方院内感染の蔓延を発端として、研究されてきた接合因子として R 因子がある。R 因子の伝達と F 因子の関連は、同一細胞内に両因子が存在する場合に F 因子が R 因子の伝達に負に働くとの報告があるが、詳細は明らかではない。我々は R388 の研究中に、F 因子の存在が R388 の伝達を促進する、現在まで報告のない現象を見いだしたので報告する。

【方法と結果】

R388 の伝達は、同一細胞内に F 因子が存在することによって 100 倍程度増強された。これをさらに確認するため、我々が R388 の研究中に分離した、伝達効率が 0.1%程度に低下した R388m-1 と名付けた自然発生変異プラスミドの伝達への影響でも同様の結果が得られた。今回 JM109F’を用いてこの現象を確認したが、JM109F’は自己伝達能を欠損しているため、F 因子の伝達と R 因子の促進は無関係であることを示唆する結果を得た。このような F 因子の存在が R 因子の伝達を促進する現象はこれまでに報告がなく、接合因子同士の新しい相互作用の可能性を示唆する。

R388, conjugation, F-factor

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A02p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A02 会場

放線菌線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析

Analysis of conjugal transfer mechanism in Streptomyces linear conjugative plasmid.

○大橋 沙季[1]、丸山 直也[1]、池田 治生[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大学、[2]北里大学)
○Saki OHASHI[1], Naoya MARUYAMA[1], Haruo IKEDA[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kitasato Univ.)

接合伝達は遺伝子水平移動機能の一つであり、細菌の遺伝的多様性増加に関与し、長大な DNA の導入手法として着目されてきた。我々は放線菌の接合伝達機構に興味を持ち、*Streptomyces nigrifaciens* 由来の環状プラスミド pSN22 について研究を進めてきた。放線菌には環状の他、接合性の線状のプラスミドが存在するが、その伝達機構は不明点が多い。我々は、線状プラスミドの接合伝達機構を明らかにするため、*S. avermitilis* 由来の伝達性線状プラスミド SAP1 に着目し、接合伝達関連遺伝子領域の機能解析、及び線状プラスミドの接合伝達機構の解析を目的とした。

SAP1 において接合伝達に必須領域を決定したところ、pSN22 の *traA, traB* に相当する領域が必要であった。*S. lividans* 由来の SLP2 の複製領域を用い、線状、環状両方で機能できるベクターpLUS980 を用いてこれらの領域による接合伝達能を調べたところ、環状体では伝達可能だったが、線状体では SAP1 の末端領域にコードされるヘリカーゼ遺伝子領域の *ttrA* が必要であった。さらに pSN22 接合の場合に必要な TraB が認識するシス領域を探索したところ、シス因子領域の偏在は認められなかった。これらの結果を総合し、放線菌線状プラスミドの接合伝達機構の特徴について考えられるモデルを提唱する。

Streptomyces, Conjugation, Linear plasmid

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A02p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A02 会場

トキイロヒラタケの形質転換法の開発とその応用
Development of transformation methods in *Pleurotus salmoneostaramineus* L. Vass.
○福田 泰久、魚川 岳登、佐藤 魁、川野 雄亮、清原 昴輝、阿部 美穂、白坂 憲章 (近畿大農)
○Yasuhisa FUKUTA, Taketo UOKAWA, Kaito SATO, Yusuke KAWANO, Kouki KIYOHARA, Miho ABE, Norifumi SHIRASKA (Kindai Univ.)

【背景と目的】
きのこ類微生物の最大の特徴は、肉眼で観察可能な大型の子実体を形成するという現象である。栄養生長菌糸期から生殖生長期への変換のメカニズムはほとんど解明されていない。子実体形成期に発現量が大きく変化する遺伝子を破壊し、その表現型を観察することで関与する遺伝子を推定する手法が、スエヒロタケ（*Shizophyllum commune*)、ウシグソヒトヨタケ（*Coprinopsis cinerea*)、ヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）などで行われてきた。当研究室では、（１）「食用である」（２）「人工栽培が安定して比較的容易に行える」（３）「原基形成時にピンク色に発色することで生殖生長期への移行が明確である」という特徴をもつ、トキイロヒラタケ（*Pleurotus salmoneostramineus* L. Vass）に着目し、実験モデルとして適していると考えた。本研究では、トキイロヒラタケの形質転換法の構築、及びその応用について検討した。
【材料と方法】
供試菌株には *P. salmoneostramineus* NBRC31859 株を用いた。本菌株を親株に単胞子分離を行い、ホスト株に用いる単核菌糸体を取得した。液体培養後（２４℃、１０日間）の菌体をビーズショッカーで破砕し、再度培養を２時間行った。プロトプラストの調製には Yatalase を基本とした酵素液を用い、３０℃で３時間反応を行なった。外来遺伝子の導入には PEG/$CaCl_2$ 法を用いた。形質転換体の選抜には抗生物質（ハイグロマイシン B、カルボキシン、ビアラフォス）を用い、それぞれの耐性遺伝子を連結した環状ベクターを使用した。
【結果と考察】
子実体形成後の NBRC31859 株由来単胞子分離株の中より、単核菌糸体でも子実体を形成する株が得られた。それぞれの分離株は生育速度、色づきや子実体の形状に特徴が見られた。その中で N13 株を選択し、形質転換実験のホスト株として使用した。PEG 法により上記に示したそれぞれの抗生物質に耐性をもつ菌株を取得した。発表では、ターゲット遺伝子破壊や異種遺伝子発現の検討についても報告する。

Pleurotus salmoneostramineus, mushroom, transformation

発表責任者：福田泰久（yfukuta@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A03a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A03 会場

新規 PKC 阻害剤 Z-705 の糸状菌特異性と既存 PKC 阻害剤との作用性比較解析
Analysis of the filamentous fungal specific activity of the novel PKC inhibitor Z-705 and the comparison of its activity to that of the other PKC inhibitor

○菅原 亜寿美[1]、吉見 啓[2]、庄司 郁央[1]、中山 真由美[2]、藤岡 智則[3]、河合 清[3]、萩原 大祐[2,4]、片山 琢也[5]、堀内 裕之[5]、梅山 秀明[6]、阿部 敬悦[1,2]([1]東北大院農・生物産業創成、[2]東北大・未来研、[3]クミアイ化学工業、[4]筑波大生命環境、[5]東大院農、[6]中央大理工)
○Asumi Sugahara[1], Akira Yoshimi[2], Fumio Shoji[1], Mayumi Nakayama[2], Tomonori Fujioka[3], Kiyoshi Kawai[3], Daisuke Hagiwara[2,4], Takuya Katayama[5], Hiroyuki Horiuchi[5], Hideaki Umeyama[6], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad.Sch.Agric.Sci.Tohoku Univ., [2]NICHe.Tohoku Univ., [3]Kumiai Chemical Industry Co.Ltd, [4]Life and Environmental Sci.Tsukuba Univ., [5]Grad.Sch.Agric.Sci.Tokyo Univ., [6]Facul.Sci.Engin.Chuo Univ.)

【背景・目的】Cell wall integrity シグナル伝達経路（CWIS 経路)は，真菌類の細胞壁構築に関わるシグナル伝達経路として知られている。本経路はセンサータンパク質群，Protein kinase C (PKC)，MAP キナーゼ経路から構成され，多くの細胞壁合成酵素遺伝子の転写を制御する。本経路において PKC は中枢の役割を担っており，糸状菌のモデル生物 *Aspergillus nidulans* の PkcA やイネいもち病菌の PKC（MgPKC1）の欠損は致死であることが知られている。このことから，真菌 PKC は新たな薬剤標的候補として注目されている。近年，MgPKC1 に対する阻害剤探索のため立体構造モデリングによる *in silico* スクリーニングおよび寒天平板培地上でのイネいもち病菌生育阻害試験が行われ，約 80 万種の候補化合物の中から Z-705 が選抜された。Z-705 は寒天平板培地上でイネいもち病菌に対する生育阻害効果が認められたが，イネ葉上におけるいもち病防除効果は認められなかった。そのため，本化合物を実用化するには化合物改変による活性の向上が必要だと考えられた。本研究では，出芽酵母において糸状菌の PKC 阻害剤評価系を構築し，Z-705 の糸状菌 PKC に対する阻害活性を評価することを目的とした。また，イネいもち病菌の PKC に対する Z-705 の阻害作用についても評価した。
【方法・結果】まず，酵母ゲノム上の *PKC1* 遺伝子配列を改変し，キナーゼドメインのみを糸状菌（イネいもち病菌，*A. nidulans*）由来のドメインへと置換した酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株（キメラ PKC 株）を作製した。次に，キメラ PKC 株に対する Z-705 の生育阻害効果を評価したところ，キメラ PKC 株で生育の遅延が確認された。このことは，Z-705 が糸状菌 PKC に対し選択毒性を有することを示唆している。また, Z-705 の PKC 阻害による CWIS 経路への影響を評価するため, PKC 下流遺伝子（*MLP1*）の転写レベルおよび PKC 下流の MAP キナーゼ Mpk1p のリン酸化レベルを解析した。その結果，Z-705 処理において糸状菌キメラ PKC 発現株でのみ *MLP1* 遺伝子発現の低下と Mpk1p のリン酸化レベルの低下が確認された。すなわち，Z-705 は糸状菌 PKC を特異性に阻害することが強く示唆された。さらに，既存の PKC 阻害剤スタウロスポリン（STS）と Z-705 の PKC 阻害効果を比較したところ，Z-705 は糸状菌 PKC に対して STS と遜色ない阻害効果を示すことが明らかとなった。次に，CWIS 経路下流の遺伝子発現を指標として，イネいもち病菌に対する Z-705 の PKC 阻害作用を解析したところ，Z-705 はイネいもち病菌の PKC に対しても STS と同等の阻害作用を示した。興味深いことに，Z-705 にはイネいもち病菌のメラニン化を抑制する効果も認められた。現在，PKC 阻害とメラニン合成抑制の関連性についても考察を進めている。

Protein kinase C inhibitor, Magnaporthe grisea, Cell wall integrity signaling

講演番号：3A03a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A03 会場

Phenotypic variations indicate an *in vivo* evolution in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*

○ Cai BIAN[1], Daisuke HAGIWARA[1,2], Yoko KUSUYA[1], Akira WATANABE[1], Hiroki TAKAHASHI[1,3] ([1]MMRC, Chiba Univ., [2]Life Env. Sci., Tsukuba Univ., [3]MCRC, Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus is a major cause of invasive fungal infections in humans. We previously reported that *A. fumigatus* strains serially isolated from the same patients with aspergillosis become resistant to azole drugs. Although these strains become resistant to azole drugs, it is unclear if their characteristics are also changed by other environmental stresses, such as heat and oxidative stress. Here we investigated whether serially isolated *A. fumigatus* strains evolve to adapt to stresses in the host environment. We performed the reagent sensitivity assays using cell wall-perturbing reagents, i.e. Congo red and Calcofluor white as well as hydrogen peroxide to monitor strains' cell wall integrity and oxidative damage tolerance, respectively. As a result, we found a weak decrease of strains' resistance to hydrogen peroxide compared with formerly isolated ones. While resistance to the cell wall-perturbing reagents has changed for most strains, we did not observe an obvious pattern of their variations. Our results suggest that phenotypic evolutions affecting cell wall integrity and oxidative damage tolerance occur in *A. fumigatus* during infection.

Aspergillus fumigatus, phenotypic variation, azole resistance

講演番号：3A03a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A03 会場

小胞体ストレス応答は麹菌のアミラーゼ生産に必要である
Unfolded protein response is required for amylolytic enzyme production by *Aspergillus oryzae*.
○田中 瑞己[1]、河原崎 泰昌[1]、新谷 尚弘[2]、五味 勝也[2] ([1]静県大食栄、[2]東北大院農)
○Mizuki TANAKA[1], Yasuaki Kawarasaki[1], Takahiro Shintani[2], Katsuya Gomi[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Tohoku Univ.)

真核生物は、小胞体内への異常たんぱく質の蓄積を防ぐため、Unfolded protein response (UPR) と呼ばれる小胞体ストレス応答機構を有している。糸状菌の UPR では、小胞体膜貫通型エンドヌクレアーゼである IreA が異常タンパク質の蓄積により活性化し、転写因子をコードする *hacA* の pre-mRNA に存在する 20-23 塩基のイントロンを切断する。そして、イントロンが除かれた *hacA* mRNA から活性型 HacA が翻訳され、小胞体内で機能する分子シャペロンである BipA や PdiA などの遺伝子発現が誘導される。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、マルトース存在条件下でアミラーゼを高生産するが、アミラーゼ生産に伴って UPR が誘導されることが明らかとなった。さらに、*ireA* の条件的発現株を作製したところ、*ireA* の発現を抑制することでアミラーゼ生産条件での生育が完全に失われ、アミラーゼの生産を抑制することで生育が回復したことから、麹菌のアミラーゼ生産条件での生育に UPR が必要であることが示された（Tanaka *et al.*, *Fungal Genet. Biol.*, 2015)。しかし、UPR の抑制がアミラーゼ生産に与える影響については不明であったことから、本研究では *ireA* 発現抑制株のアミラーゼ生産について解析を行った。

ireA 発現抑制株の α-アミラーゼ生産を調べた結果、野生株と比較して α-アミラーゼの生産が著しく抑制された。IreA によって切断される 20 塩基のイントロンを人為的に欠失させた *hacA* を導入したところ、*ireA* 発現抑制株の α-アミラーゼ生産が野生株と同等にまで回復した。このことから、UPR が α-アミラーゼ生産に必要であることが示唆された。さらに、α-アミラーゼ遺伝子の転写産物量を調べた結果、*ireA* 発現抑制株でも強い発現が認められたことから、UPR は転写後の過程において α-アミラーゼの生産に必要であることが示唆された。*ireA* 発現抑制株において α-アミラーゼ遺伝子のプロモーターで *bipA* や *pdiA* を強制発現させた結果、*pdiA* を強制発現させた場合において、アミラーゼ生産条件における生育がわずかに回復した。また、いずれの強制発現株においても、α-アミラーゼの生産が有意に回復したことから、UPR による分子シャペロン遺伝子の発現誘導が α-アミラーゼ生産に必要であることが示唆された。現在、他の分子シャペロンの強制発現による影響についても解析を行っている。

Aspergillus oryzae, Unfolded protein response, Amylase

発表責任者：田中瑞己（mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A03a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A03 会場

長期高濃度エタノールストレスによる酵母細胞骨格への影響：小型セプチンリングの形成誘導

Long-term severe ethanol stress induces formation of the multiple small rings of septin in yeast

穂本 聖奈、○井澤 真吾（京都工繊大応生）
Sena HOMOTO, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

【目的】 高濃度のエタノールは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にとっても深刻なストレスであり、ワインや日本酒の醸造過程終盤では発酵効率の低下などが引き起こされる。酵母のエタノールストレス応答については数多くの研究報告があるものの、長期の高濃度エタノールストレス下における酵母の生理は十分に解明されていないのが現状である。今回我々は、酵母からヒトまで広く保存されているセプチン (septin) に着目し、長期高濃度エタノールストレス下における挙動を解析した。セプチンは第四の細胞骨格とも呼ばれる GTP 結合型タンパク質であり、filament や ring といった高次構造を形成する。*S. cerevisiae* では Cdc3/10/11/12/Shs1 によって構成されており、septin ring や septin collar を bud neck に形成する。Septin ring は出芽や細胞質分裂に関連するタンパク質の足場となるほか、母-娘細胞間の拡散障壁として重要な働きをしている。
【結果と考察】対数増殖期の酵母W303-1A株を10% (v/v) エタノールストレスで処理すると、時間経過に伴って緩やかながら細胞増殖が再開したものの、多くの細胞はアクチン細胞骨格の脱極性化を示した。また、一部の細胞では偽菌糸様の細胞伸長や不完全な細胞質分裂などの形態異常が観察された。さらに、Cdc3/10/11/12/Shs1は通常のseptin ringとは異なる外径0.7 μm程度の複数の環状構造 (multiple small rings, MSRs) を形成することが新たに確認された。MSRsの形成はCdc42に非依存的であり、Shs1やCdc10を欠損すると形成されなくなったことから、通常のseptin ringの形成様式とは異なることが示唆された。また、アクチン細胞骨格の構成的な脱極性化を引き起こすLatrunculin Aで長時間処理することによってもMSRsの形成が誘導された。一方、哺乳類のセプチンはアクチン非依存的に自己集合して環状構造を形成することが報告されている (Kinoshita *et al.*, *Dev. Cell*, **3**:791-802, 2002) 。そのため、高濃度エタノールストレス下の酵母細胞でも、セプチンがアクチン非依存的に自己集合したのではないかと考えられた。

septin, ethanol stress, actin cytoskeleton

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：3A03a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A03 会場

高濃度エタノールストレスによる変性タンパク質の蓄積と酵母 *BTN2* の発現誘導

Severe ethanol stress induces the aggregate formation of mis-folded proteins in yeast

○白木 千夏、加藤 沙枝、井澤 真吾（京都工繊大応生）
○Chika SHIRAKI, Sae KATO, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

【目的】 高濃度エタノールストレスは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に転写パターンの変化を引き起こす一方で、bulk poly(A)$^+$ mRNA の核外輸送や翻訳活性を強く阻害する。そのため、大部分の遺伝子は、転写が活性化されてもタンパク質の合成が行われず、発現が抑制されてしまう。一方、*BTN2* は高濃度エタノールによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳され、その発現が誘導される(Yamauchi and Izawa, *Front. Microbiol.*, **7**:1319, 2016)。また、急激なエタノール濃度の上昇だけでなく、アルコール発酵によって徐々にエタノール濃度が上昇した場合や熱ショックストレス下でも、*BTN2* の発現が誘導されることを昨年度の本大会で報告している。今回、エタノールストレス下における Btn2 の生理的な役割について検討した。

【結果と考察】熱ショックによる変性タンパク質の核内 aggregate である INQ の形成に Btn2 が関与するため(Miller *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **427**:1564-1574, 2015)、高濃度エタノールストレス下でも同様の役割を Btn2 が担っていることが予想された。そこで、*BTN2* の発現を誘導する高濃度エタノールストレス条件下でも変性タンパク質が蓄積するのか検討を行ったところ、不溶性タンパク質レベルの上昇とユビキチン化の促進が 10% エタノールによって引き起こされた。また、変性タンパク質の aggregate を示す Hsp104-GFP や Ssa1-GFP の foci がエタノールストレス下でも形成された。*btn2*Δ株でも変性タンパク質の蓄積は認められたが、エタノールを取り除いた際の変性タンパク質の減少効率は、野生株と比べて有意に低下していた。さらに、分子シャペロン Hsp104 の欠損株やオートファジー関連遺伝子の欠損株などでは、エタノールストレス下での Btn2 レベルの上昇が認められた。そのため、高濃度エタノールによる変性タンパク質の細胞内蓄積に速やかに対処するために、翻訳抑制下でも *BTN2* の発現が誘導されたと考えられた。

ethanol stress, *BTN2*, protein aggregate

講演番号：3A03a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A03 会場

メタノールセンサー因子 PpWsc1 による CWI 経路依存的なペキソファジー抑制機構の解析
CWI pathway dependent repression of pexophagy by methanol-sensing factor PpWsc1
○大澤 晋、阪井 康能、由里本 博也、奥 公秀（京都大農）
○Shin OHSAWA, Yasuyoshi SAKAI, Hiroya YURIMOTO, Masahide OKU (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母のペルオキシソームはメタノール培養時に大きく発達する。培養に伴いメタノールが枯渇すると発達したペルオキシソームはオートファジー（ペキソファジー）によって選択的に分解されることから、メタノールがペキソファジーを抑制するメカニズムの存在が示唆された。これまで、選択的オートファジーの誘導メカニズムについては多くの研究がなされているが、その抑制メカニズムについては、知見が少ない。これまでの研究よりメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*のメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わるセンサータンパク質PpWsc1がペキソファジーの抑制に関与することが示唆された。本発表では、出芽酵母Wscファミリータンパク質下流のシグナル伝達経路として知られているcell wall integrity (CWI) 経路で機能するタンパク質群のペキソファジー抑制制御への関与について報告する。
【方法・結果】ペキソファジーの誘導には、ペルオキシソーム膜上タンパク質PpAtg30のリン酸化が重要な機能を示す。このリン酸化はメタノール培養時では観察されないが、*PpWSC1*破壊株（*Ppwsc1Δ*）において、このリン酸化の増加が観察される。この表現型を指標にCWI経路構成因子とペキソファジー抑制の関与について調べた。CWI経路構成因子をコードする遺伝子破壊株を作製し、メタノール培養時におけるPpAtg30のリン酸化レベルをウエスタン解析によって調べた。その結果、それら遺伝子破壊株においてリン酸化レベルの増加が確認された。これらのことからCWI経路によって、ペキソファジーが抑制されていることが示唆された。これまで、PpWsc1はメタノール誘導性遺伝子発現制御と細胞表層ストレス応答などのCWI経路の制御の両方に機能する一方、PpWsc3はメタノール誘導性遺伝子発現制御のみに機能することを報告している。メタノール培養時におけるPpAtg30リン酸化が著しく増加する*Ppwsc1Δ*株にPpWsc3を過剰発現させても、リン酸化は抑制されなかった。この結果は、ペキソファジーの抑制にはCWI経路を介した制御が重要であることを支持するものである。以上の結果より、PpWsc1はCWI経路を介してペキソファジーを抑制することが示された。

pexophagy, methylotrophic yeast, Wsc family protein

講演番号：3A03a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A03 会場

酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導

Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast

○吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大　バイオ）
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Horoshi TAKAGI (NAIST)

一酸化窒素（NO）は、微生物から哺乳類に至るで、様々な生命現象に関与するシグナル伝達物質である。哺乳類では、NO 合成酵素（NOS）によって、アルギニンを基質として NO とシトルリンを合成する。既知の NOS は NADPH から電子の受け渡しを行うレダクターゼドメインと、基質の結合を行うオキシゲナーゼドメインの 2 つのドメインから構成される。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、過酸化水素処理条件下で、NOS 様の活性が報告されている。最近当研究室において、過酸化水素処理条件下において、フラボタンパク質 Tah18 が NO 合成に関与すること、さらに Tah18 と相互作用することが知られている鉄硫黄クラスタータンパク質である Dre2 は、Tah18 とは異なり NOS 様活性を抑制することを見出した。さらに、過酸化水素処理条件下において、Tah18 と Dre2 の複合体が素早く解離し、その後 Dre2 タンパク質量が顕著に減少することを明らかにした。Tah18 は NOS のレダクターゼと相同性を示すが、オキシゲナーゼに相当する配列は存在せず、Tah18 単独では NOS 様活性を示さないと考えられる。また NOS のオルソログも酵母のゲノム上には存在しないため、酵母における NO 合成機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、Dre2 の分解機構および Dre2 の分解に伴う NO 合成量の変化に着目し、解析を行った。

哺乳類において、Caspase 3 が神経変性に伴い Dre2 のホモログタンパク質である Ciapin1 を分解することが報告されている。哺乳類では、Ciapin1 の分解が神経細胞死誘導の原因の一つと考えられているが、その詳細な機構は明らかになっていない。哺乳類の Ndor1-Ciapin1 複合体は、酵母の Tah18-Dre2 複合体と同様に NADPH から鉄硫黄クラスターマシナリーに電子を伝達することで、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生合成に関与することが知られているが、NO 合成に関する知見は報告されていない。そこで、哺乳類の Caspase 3 と類似な構造を有する酵母のメタカスパーゼ Mca1 に着目し、その遺伝子（*MCA1*）破壊株の表現型を解析した。その結果、*MCA1* 破壊株では過酸化水素処理条件下における Dre2 タンパク質量の減少が有意に抑制された。また、過酸化水素処理条件下においては NO 合成量が低下し、細胞死誘導が抑制される結果も得られた。以上の結果から、過酸化水素処理条件において、Tah18 と Dre2 の解離および Mca1 による Dre2 の分解が Tah18 依存的な NO 合成を促進し、細胞死を誘導すると考えている。哺乳類においても、Ndor1-Ciapin1 複合体が NO 合成および細胞死の誘導に関与する可能性を検討するため、現在、Ndor1 および Ciapin1 を Tah18 および Dre2 にそれぞれ置換した菌株を作製し、表現型の解析を行っている。

nitric oxide, metacaspase Mca1, yeast

発表責任者：吉川　雄樹（y-yoshikawa@bs.naist.jp）

講演番号：3A03a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A03 会場

過剰なトリプトファンによる細胞毒性の解析

Study on cytotoxicity of excess Tryptophan

○大橋 一登（群大・生調研）
○Kazuto OHASHI (IMCR, Gunma Univ.)

【背景】トリプトファン（Trp）は、生体に欠かせない必須アミノ酸の一つである。Trp は生合成に多くの ATP を消費する高価なアミノ酸であり、Trp の生合成は厳密に制御されている。Trp の大部分はタンパク質合成に用いられることが知られているが、それ以外の Trp の多くはキヌレニン（KYN）経路で代謝される。KYN 経路の代謝物である KYN は毒性を持つと考えられているが、その詳細はよく分かっていない。また、過剰な Trp の蓄積はいくつかの病態と関連することが知られているが、過剰な Trp による毒性の仕組みは意外にもよくわかっておらず、基礎的な知見が不足している。
【目的】発表者は真核生物のモデル細胞である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、過剰な Trp が細胞増殖を阻害することを見出した。さらに、Trp の分解経路と考えられるキヌレン酸合成酵素（Aro8 および Aro9）の遺伝子欠損株（*aro8Δ aro9Δ*）は過剰な Trp に顕著な感受性を示すことを明らかにした。これらの結果から、過剰な Trp の蓄積は細胞レベルで有害であることが分かってきた。本研究では、過剰な Trp による細胞毒性の分子機序を明らかにするため、KYN 経路における Trp 代謝物の毒性を検討した。
【結果】合成培地で培養した出芽酵母の野生株と *aro8Δ aro9Δ*に過剰な Trp を与えたところ、細胞中に Trp や KYN 経路の代謝物である KYN が蓄積していることを、LC-MS による細胞抽出液中の代謝物測定によって確認した。なお、*aro8Δ aro9Δ* では野生株以上に KYN が蓄積していた。これらの結果から、Trp による細胞毒性は Trp や KYN などの KYN 経路の代謝物の蓄積に起因すると予想した。まず KYN 経路の酵素遺伝子欠損株を用いて、過剰な Trp への感受性を調べた。その結果、Trp 代謝物の KYN から 3-ヒドロキシキヌレニンを合成する酵素 Bna4 の遺伝子欠損株が Trp にわずかに感受性を示したのに対し、KYN からアントラニル酸（ANT）を合成する酵素 Bna5 の遺伝子欠損株では Trp への感受性が減少した。このことから、KYN の蓄積ではなく、ANT の蓄積が Trp の毒性に関わっていることが示唆された。次に、合成培地に KYN および ANT をそれぞれ添加して、*aro8Δ aro9Δ*の生育を観察した。その結果、*aro8Δ aro9Δ*は KYN に感受性は示さなかったが、ANT には弱い感受性を示した。以上の結果から、Trp の毒性には ANT が寄与していると考えられた。また、Trp には光学異性体が存在するが、これまではL 体（L-Trp）を用いていたので、D 体（D-Trp）の毒性を出芽酵母の野生株と *aro8Δ aro9Δ*で調べた。その結果、L-Trp と同じ濃度では D-Trp の毒性は認められなかった。L-Trp の毒性は ANT の毒性より強いことを考えると、L-Trp の蓄積に特異的な毒性機構が存在する可能性が考えられた。

Tryptophan, Kynurenine, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：大橋一登（ohashi@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3A03a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A03 会場

出芽酵母のアクチン再極性化における Pkc1 による Rho GTPase 活性化因子 Rgd1 のリン酸化の関与
Involvement of phosphorylation of Rho GTPase-activating protein Rgd1 by protein kinase C in actin repolarization during stress response in the budding yeast

○野村 亘[1,3]、二股 良太[2]、後藤 剛[1,3]、河田 照雄[1,3]、井上 善晴[2]([1]京大院・農・食品生物、[2]京大院・農・応生科、[3]京大・生理化学研究ユニット)
○Wataru NOMURA[1,3], Ryota FUTAMATA[2], Tsuyoshi GOTO[1,3], Teruo KAWADA[1,3], Yoshiharu INOUE[2] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [3]Research Unit for Physiological Chemistry)

Ser/Thr キナーゼであるプロテインキナーゼ C（C キナーゼ）は、哺乳類ではこれまでに 3 グループ 10 種が確認されており、幅広い生理機能に関与することが知られている。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の C キナーゼは Pkc1 の 1 種類のみである。出芽酵母は、出芽に伴う成長軸方向への細胞成長（極性成長）により増殖するが、Pkc1 はシグナル伝達や細胞極性へ寄与することで極性成長に必須な役割を果たしていると考えられている。極性成長には、アクチン細胞骨格の成長軸方向への極性化が重要であり、これまでに Pkc1 がアクチン極性化や組織化、およびそれらの再編成に関与することが指摘されている。しかしながら、Pkc1 がどのような機構でアクチン動態に関与しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。

我々はこれまでに、Pkc1 の制御に TOR（target of rapamycin）やホスファチジルセリンが関与することを報告してきた（Mol. Cell. Biol. 2015; Cell. Signal. 2017）。さらに最近、Pkc1 の活性化に必要な Rho1 との相互作用が阻害される Pkc1 変異体発現株では、熱ショックストレス適応時のアクチン再極性化が不全となることを見出した（Small GTPases 2017）。Pkc1 は熱ショックストレスにより活性化されることから、Pkc1 はストレス適応におけるアクチン再極性化に積極的に関与すると考えられる。そこで今回、ストレス適応時のアクチン再極性化に関わる Pkc1 のターゲット分子を明らかにするため、アクチン動態に重要な Rho ファミリー低分子量 GTPases に着目して解析を行った。その結果、Rho3 および Rho4 の GTPase 活性化因子（GAP）である Rgd1 が、Pkc1 依存的にリン酸化されることを新たに見出した。Rgd1 のリン酸化レベルは熱ショックストレスにより亢進し、Pkc1 変異株ではリン酸化が見られなくなった。さらに、C キナーゼのリン酸化コンセンサス配列の情報から、Rgd1 のリン酸化部位として Ser148 に着目した。Ser148 の Ala 置換体では、Pkc1 による Rgd1 のリン酸化レベルは著しく低下した。また、Rgd1 欠損株では熱ショックストレス適応時におけるアクチン再極性化が不全となり、このアクチン再極性化の不全は $Rgd1^{S148A}$ 変異体においても観察された。Rgd1 欠損株でアクチン再極性化の不全が観察されたことから、この表現型に GTP 結合型 Rho3 および Rho4 の関与が期待されたが、予想に反して Rho3 および Rho4 の構成的活性化変異体発現株の熱ショックストレス適応時におけるアクチン再極性化の不全は認められなかった。以上のことから、Rgd1 が Pkc1 のターゲット分子であるとともに、ストレス適応時のアクチン再極性化機構において、Pkc1 による Rgd1 のリン酸化の関与が強く示唆された。

protein kinase C, actin, yeast

発表責任者：野村　亘（nom2@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A03a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A03 会場

出芽酵母におけるナンセンス変異により形成される C 末端にポリ Q 配列を有する変異 Cyc8 のプリオン様の挙動

Nonsense mutation creates mutated Cyc8 carrying polyQ at its C-terminus and induces prion-like behavior of the mutated Cyc8 in *Saccharomyces cerevisiae*

○河井 重幸[1]、村田 幸作[2] ([1]京大院農、[2]摂南大理工)
○Shigeyuki KAWAI[1], Kousaku MURATA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. & Eng., Setsunan Univ.)

【背景】プリオンは遺伝性のタンパク質凝集体であり、ほ乳類ではウシ狂牛病等の病因である。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（酵母）のプリオンは寧ろ転写・翻訳様式の多様性を高め、環境適応確率を高める有用因子と考えられている。しかし、酵母のプリオン研究では、特定のタンパク質を「人為的に強制発現」することでプリオン形成を誘導しており、どういう機序で「自然に」プリオン（凝集体）が形成されるか？というプリオン形成機序は殆ど不明である。他方、酵母はポリグルタミン（ポリ Q）配列を内部に持つ多くのポリ Q 含有タンパク質を有する。その多くが転写調節に関与する。ヒトでは、ポリ Q 含有タンパク質の凝集によるハンチントン病など 9 種類の神経関連疾患が知られ、またタンパク質の凝集はアルツハイマー病などの病因の一つでもある。

酵母の Cyc8 タンパク質（全長 966 残基）は Tup1-Cyc8 転写コリプレッサー複合体の構成因子であり、内部にポリ Q 配列（557～587 残基：ポリ$[Q]_{31}$）を有する。酵母はマンニトール（褐藻に著量含まれるポリオール）を資化できない。しかし我々は出芽酵母をマンニトール含有培地に塗布して長期間培養するとマンニトール資化能（Mtl+）を獲得した株（Mtl+株）が自然に得られること、Mtl+獲得の原因は Tup1-Cyc8 遺伝子への変異であること、Mtl+株ではマンニトール資化関連遺伝子の他にソルビトールデヒドロゲナーゼ遺伝子も転写誘導されていることを明らかにしている [1)]。一方で、原因の特定に至らなかった Mtl+株（MK4010 株）は、5 mM の塩酸グアニジン（GuHCl）を含む培地での生育により Mtl+を失った（GuHCl 感受性を示した）[2)]。これはプリオン様の因子が MK4010 株の Mtl+獲得の原因である可能性を示した [2)]。

【結果】MK4010 の Cyc8 遺伝子（*CYC8*）の再シーケンスと相補実験により、*CYC8* の c.1765C>T 変異が Mtl+獲得の原因であることが分かった。この変異は、*CYC8* のポリ Q の Q コドン（CAG）へのナンセンス変異（→TAG）であり、C 末端にポリ Q 配列を持つ変異 Cyc8_ポリ Q が形成されていた。*TUP1* や *CYC8* に変異を持つ他の Mtl+株の GuHCl 感受性とソルビトール資化能（Sor+）を調べたところ、全てが Sor+を示したが、やはり変異 Cyc8_ポリ Q を有する MK4456 株 [1)]が同感受性を示した。GuHCl 感受性を示す Mtl+または Sor+の獲得を指標に Mtl+株または Sor+株を探索したところ、得られた株においても Q コドンへのナンセンス変異により変異 Cyc8_ポリ Q が形成されていた。MK4010 株のマンニトール資化能は Hsp104 のドミナントネガティブ作用で低減し、*HSP104* や *RQN1* の削除で消失した。これらの結果は、*CYC8* のポリ Q の Q コドン（CAG または CAA）への「自然に起こりうる」ナンセンス変異（→TAG または→TAA）により形成された、C 末端にポリ Q 配列を持つ変異 Cyc8_ポリ Q がプリオン様の挙動を示す可能性を示した。

1) Chujo *et al*. Appl. Environ. Microbiol. 81:9-16 (2015).
2) 田中ら. 日本農芸化学会 2016 年度大会　大会プログラム集, p. 37. 2F054

Saccharomyces cerevisiae , prion, polyQ

発表責任者：河井重幸（kawais@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A03a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A03 会場

Pib2 を介した TORC1 活性化機構の解析
Activation mechanism of TORC1 by Pib2
○谷川 美頼、山本 勝良、前田 達哉（東京大学分生研）
○Mirai Tanigawa, Katsuyoshi Yamamoto, Tatsuya Maeda (Tokyo Univ)

プロテインキナーゼ TOR を触媒サブユニットに持つ TOR 複合体 1（TORC1）は、細胞成長を制御する過程の中核を担っており、その構造、機能ともに真核生物に広く保存されている。TORC1 は、アミノ酸などの栄養や増殖因子によって活性化され、タンパク質合成などの同化作用を促進するとともにオートファジーなどの異化作用を抑制することで細胞成長を促す。この制御は厳密になされており、その破綻は糖尿病やがんなどの疾病の進行と深く関わっている。

アミノ酸による TORC1 の活性化機構は、独立した複数の経路を介してなされることが明らかになっている。そのうちの一つは、低分子量 G タンパク質 Rag（あるいは酵母オルソログ Gtr）のヘテロ 2 量体を介した経路である。Rag/Gtr 2 量体の活性を制御する種々の分子が同定されており、その多くは哺乳類・酵母間で保存されている。もう一方は、グルタミンによって活性化されることが示唆されていたがその分子機構は不明であった。

我々は酵母において、Gtr 2 量体を介さない TORC1 の活性化に、FYVE ドメインを有する分子 Pib2 が必要であることを明らかにした。Pib2 を介した TORC1 の活性化は液胞膜上で起こり、予想されていた通りグルタミン特異的であった。さらに Pib2 は TORC1 とグルタミン依存的に結合することから、Pib2 は TORC1 の活性化に直接的に関与していると考えられる。そこで、Pib2 による TORC1 の活性化機構を明らかにする目的で *PIB2* の活性化型変異体のスクリーニングを行ない、複数の変異体を取得することに成功した。それらの変異体の解析からみえてきた Pib2 による TORC1 の活性化機構について議論したい。

TORC1, rapamycin, amino acid

講演番号：3A03a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析

Study on control of microtubule organization by fission yeast cell morphogenesis network

○植田 早紀[1]、水沼 正樹[2]、久米 一規[2] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研)
○Saki UEDA[1], Masaki MIZUNUMA[2], Kazunori KUME[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. grad. sch.)

【目的】細胞極性は細胞固有の形を決定する重要な因子である。細胞極性は、細胞形態のみならず、細胞の分裂、運動など細胞に方向性を与え、細胞の機能に重要な役割を担っている。我々は、細胞極性制御に重要なシグナル伝達経路の解明を目指し、これまでに分裂酵母を用いた解析から、進化上保存された細胞形態形成ネットワーク・MOR（Morphogenesis Orb6 Network）を明らかにした。MOR 経路は、Pmo25、Mor2 と 2 つのキナーゼ(Nak1、Orb6)により構成される。MOR 経路は、酵母において細胞極性に重要なアクチンの局在を制御する。一方、線虫やハエでは神経突起形成に、ヒトでは腸上皮細胞の極性制御に重要である。

興味深いことに、MOR 経路変異体が微小管重合阻害剤(TBZ)に感受性を示したことから、MOR 経路はアクチンのみならず微小管制御にも関与することが示唆された。そこで本研究では、MOR 経路による新規の微小管制御機構の解明を目的とした。

【方法・結果】これまでに我々は、MOR 経路と微小管とをつなぐ因子を明らかにするために、*mor2* 変異体（MOR 経路の下流分子）が示す TBZ 感受性を抑圧する *sup* 変異体を取得し、解析を行ってきた。*sup* 変異体の原因遺伝子は、既知の微小管構成因子である *nda2*（α-チューブリン）、*nda3*（β-チューブリン）を含む、6 つの遺伝子座に分類された。

本研究では、*sup* 変異が *mor2* 変異体の TBZ 感受性を抑圧する原因を明らかにするために、野生株、*mor2*、*mor2sup* 二重変異体の微小管構造の観察を行なった。その結果、*mor2* 変異体は、野生株と比べ、細胞質微小管の数が増加していた。一方、ほとんどの *mor2sup* 二重変異体では、*mor2* 変異体で増加した細胞質微小管の数が野生株程度まで減少していた。つまり、*mor2* 変異体が示す TBZ 感受性は、細胞質微小管の数の増加と関係があることが示唆された。現在、*sup* 変異体の原因遺伝子の同定を行っている。さらに、MOR 経路による微小管制御に重要なシグナル伝達経路を明らかにするため、タンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）に注目し、キナーゼの遺伝子破壊により、*mor2* 変異体の TBZ 感受性を抑圧する株を探索している。

fission yeast, cell polarity, microtubule

講演番号：3A03a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A03 会場

Rst2 の高発現による細胞への影響

Effect of overexpressed Rst2 in cells

○竹中 航平、川向 誠、松尾 安浩（島根大生資）
○Kohei Takenaka, Makoto Kawamukai, Yasuhiro Matsuo (Shimane Univ.)

分裂酵母でプロテインキナーゼ A(PKA)は触媒サブユニットである Pka1 と調節サブユニットである Cgs1 からなるヘテロ 4 量体である。炭素源が豊富な条件下では Cgs1 から Pka1 が解離して核内に移行することで下流因子をリン酸化制御している。これまでに分裂酵母では糖新生、減数分裂への移行の制御、ストレス応答、老化などへの関与が報告されている。Pka1 の標的の 1 つとして転写因子である Rst2 が報告されている。Rst2 は、減数分裂への移行では、転写因子をコードする *ste11*、グルコース制限下ではフルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする *fbp1* の発現を制御している。また、これらの遺伝子のプロモーター領域に存在している STREP(stress-starvation response element of *Scizosaccharomyces pombe*)配列(CCCCTC)に Rst2 が C2H2-Zinc Finger DNA 結合ドメインを介して結合し、転写を制御している。Rst2 の高発現は、細胞生育に影響をおよぼすことが、網羅的な解析で報告されているが、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では Rst2 の高発現によって、細胞がどのような影響を示すのかを明らかにすることを目的とした。

高発現プロモーターである *nmt1* プロモーター下で、*rst2* 遺伝子を高発現させた形質転換体(*nmt1-rst2*)を用いて、細胞生育に影響を及ぼすかを解析したところ、明らかな生育阻害を示した。そこで、形態を観察したところ、*nmt1-rst2* 株において隔壁を形成した細胞の割合が大幅に増加しており、マルチセプタムを形成している細胞も観察された。次に、*nmt1-rst2* 株での DNA 含量を解析した。その結果、Rst2 高発現株において、G1 アレストした細胞や DNA 含量が増加している細胞が確認された。さらに h^{90} 株において Rst2 の高発現は vector 株よりも早く接合や胞子形成を誘導した。これは Ste11 の発現を増加させ、細胞周期の G1 でアレストを誘導し、有性生殖過程への移行を促進していることが示唆された。また、*nmt1-rst2* 株では、細胞形態が丸くなっているものがみられたため、GFP-Atb2 を用いて、微小管の形態を観察したところ、微小管が細胞先端で湾曲している細胞が約 10%みられた。以上の結果から、Rst2 の高発現は、細胞形態、細胞増殖、微小管構造、核構造などに影響することが示唆された。しかしながら、Rst2 が保持する C2H2-Zinc Finger DNA 結合ドメインを欠損させた Rst2(C2H2Δ)の高発現株を解析したところ、DNA 含量を除いて、野生型 Rst2 の高発現で見られた表現型と同じであった。このことから Rst2 高発現で見られた多くの表現型は Rst2 による転写制御ではなく、高発現によって間接的に影響を及ぼしていることが示唆された。現在、EMS 処理によって、生育阻害を一部抑圧する変異体を取得したため、解析している。

Rst2, Pka1

講演番号：3A03a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A03 会場

分裂酵母セラミドリモデラーゼ Cwh43 は栄養源である窒素源とグルコースへの応答を調節し、中性脂肪の蓄積を抑える

Ceramide remodelase, Cwh43, controls proper responses to nitrogen and glucose, and maintains neutral lipid homeostasis in fission yeast

○中沢 宜彦[1]、照屋 貴之[1]、佐二木 健一[1]、熊田 和貴[1]、新川 織江[1]、髙田 順子[1]、齋藤 成昭[2]、柳田 充弘[1] ([1]沖縄科学技術大学院大、[2]久留米大)
○ Norihiko NAKAZAWA[1], Takayuki TERUYA[1], Kenichi SAJIKI[1], Kazuki KUMADA[1], Orie ARAKAWA[1], Junko TAKADA[1], Shigeaki SAITOH[2], Mitsuhiro YANAGIDA[1] ([1]OIST, [2]Kurume Univ.)

セラミドは細胞膜を構成するスフィンゴ脂質の一つであり、細胞の増殖や分化を制御するシグナルとして働く。真核生物で保存されたセラミドリモデラーゼ Cwh43 は、細胞膜に係留される GPI アンカー型タンパク質の脂質部分をセラミドに変換するユニークな酵素であるにも関わらず、その生理的役割は謎につつまれている。今回、我々は窒素源とグルコースのどちらの欠乏にも適切に応答できない分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 高温感受性変異体の中から、*cwh43* 遺伝子の変異体を 5 株同定した。興味深いことに、これらの変異体では細胞内の中性脂肪（トリアシルグリセロール）が過剰に蓄積していることが明らかとなった。本発表では、メタボローム解析から判明した *cwh43* 変異体での代謝物の変動を踏まえ、セラミドリモデラーゼのメタボリックな役割を考察する。また、セラミドはヒトの皮膚の保湿やバリア機能をもつことから、スキンケアと肥満抑制を結びつけるバイオマーカー候補としての Cwh43 についても議論したい。

Ceramide, Metabolome, Fission yeast

発表責任者：中沢宜彦（nakazawa@oist.jp）

講演番号：3A03a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A03 会場

独立した二つのヘキソース感知機構を介した糖輸送体の発現制御：細胞外ヘキソース濃度モニター機構と細胞内解糖系速度モニター機構

Dual hexose monitoring system to regulate hexose transporter expression: extracellular hexose level sensing pathway and intracellular glycolytic flux monitoring pathway

○寺田 祐子、副島 朗子、齋藤 成昭 (久留米大分生研)
○Yuko Terada, Saeko Soejima, Shigeaki Saitoh (Inst. of Life Sci,. Kurume Univ.)

生物は栄養環境をモニターし、栄養素の取り込みや代謝を適切にコントロールする必要ある。ヘキソース類（グルコース、フルクトース）は炭素源、エネルギー源として重要であり、生物はヘキソース環境をモニターしてヘキソース輸送活性を制御するしくみを備えていると予想されるが、その分子機構は不明な点が多い。我々は真核生物のモデル細胞として分裂酵母を用い“生物が細胞レベルでヘキソース環境を認識し、適応するための分子機構”、特にヘキソース濃度の変化に応答して糖輸送体の発現を制御する分子機序を研究してきた。分裂酵母においては、ヘキソース輸送体 Ght5 の発現が培地中のヘキソース濃度に応じて制御される。ヘキソース濃度に応じた Ght5 の発現制御には、Ssp1 (CaMKK)-Ssp2 (AMPK) シグナル経路を介した、転写抑制因子 Scr1 の局在制御が重要であった [MBoC, 26, 373, 2015]。今回我々は、解糖系の初反応を触媒するヘキソキナーゼ遺伝子のうち、一つを破壊した株（*hxk2*Δ）では、培地中のヘキソース濃度に関わらずヘキソース輸送体 *ght5*+遺伝子の発現レベルが恒常的に高いことを見出した。予想外にも、*hxk2*Δにおいて転写抑制因子 Scr1 の局在は WT と同様で、培地中のヘキソース濃度に応じて制御された。これらの結果は、Scr1 の局在制御を介さない、新規の *ght5*+発現制御機構の存在を示唆した。*hxk2*Δでは解糖系によるヘキソース代謝速度（解糖系速度）が有意に低下していた。*hxk1*+遺伝子を異所発現させて解糖系速度を回復させたところ、*ght5*+遺伝子の発現が抑制された。これは解糖系速度に応じても *ght5*+の発現が制御されることを示している。上記の結果より我々は、*ght5*+遺伝子の発現が二つの異なるシグナル経路によって制御されると考える。一つは細胞外ヘキソース濃度依存的な Ssp1-Ssp2 シグナル経路による制御、もう一つは細胞内解糖系速度をモニターする制御経路である。次に、解糖系速度モニターの分子機構を明らかにすべく、細胞のエネルギー状態を反映する代謝物として代表的な ATP の濃度と、Ght5 発現量が逆相関する可能性を検討した。*hxk2*Δは *ght5*+遺伝子を高発現するにもかかわらず ATP 濃度は野生株の 5 倍高く、これは TCA 回路の亢進によるものであった。この結果は、ATP 及び ATP 関連代謝物（cAMP など）の細胞内濃度に応じて *ght5*+遺伝子の発現を制御する可能性を否定した。解糖系酵素の遺伝子をそれぞれ破壊して Ght5 発現を調べたところ、解糖の第六段階(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)より上流で産生される代謝物の減少が、*ght5*+遺伝子の発現を誘導する可能性を得た。解糖によるヘキソース代謝経路は酵母からヒトまで高度に保存されており、酵母で見出した解糖系速度をモニターして糖輸送体の発現を制御する分子機構が、哺乳細胞でも保存されている可能性があると考えている。

Schizosaccharomyces pombe, glucose repression, glucose transporter

発表責任者：寺田祐子（terada_yuuko@kurume-u.ac.jp）

講演番号：3A04a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A04 会場

Possible role of L. paracasei BL23 sirtuin in cell division and/or cell shape regulation as indicated by intracellular localization and cell length analysis

○Glaezel Angelique Torres[1], Hotaka Atarashi[1], Takuya Gonda[1], Akinobu Kajikawa[2], Aiko Hirata[3], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [3]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

Purpose: Sirtuin has been associated in prolonging lifespan of different model organisms. It has been shown to have an enzymatic activity of NAD^+-dependent protein deacetylation targeting acetylated proteins. Previous study confirmed the existence of sirtuin homolog in *Lactobacillus paracasei* BL23 (LpSirA), which may have a role in controlling protein synthesis (Atarashi et al, 2016). This study aims to determine other targets and possible roles of sirtuin in BL23.

Methods: This study generated deletion (Δ*sirA*), sirtuin overexpressor (high*sirA*), revertant (BKN 242 and BKN 258) and Venus (GFP) tagged sirtuin (venus-*sirA*) strains for microscopic and cell length analysis. Immunofluorescence analysis of wild type, Δ*sirA* and high*sirA*; and observation of venus-*sirA* were performed to determine intracellular localization of sirtuin for fixed and living cells respectively. For cell length analysis, sizes were measured from pole to pole and data were analyzed using Tukey-Kramer HSD test with JMP software (SAS Institute, Inc). Differences with a P value of < 0.05 were considered statistically significant.

Results: Immunofluorescence analysis revealed localization of LpSirA at cell division plates, cell poles and spirally all throughout the cells. In addition, clear spiral localization of sirtuin was observed in venus-*sirA*. In the course of microscopic observation, the length of the cells was found to be significantly affected by the cellular levels of LpSirA. Results revealed statistically significant differences in cell length of wild type, Δ*sirA* and high*sirA* having a P-value of <0.001 for all pairs. Wild type cell length averaged 2.68 ± 0.77 µm whereas Δ*sirA* and high*sirA* averaged 2.1 ± 0.58 µm and 2.96 ± 0.84 µm respectively. In addition, almost half (46.9%) of the Δ*sirA* cells analyzed had size shorter than 2 µm whereas 12.6% of the high*sirA* cells analyzed had size greater than 2 µm.

Conclusion: Results of these analyses suggest that LpSirA may also have roles in cell division and cell shape regulation of *L. paracasei BL23.*

Reference: H. Atarashi et al (2016). Identification of Sirtuin and Its Target as the Ribosomal Protein S4 in *Lactobacillus paracasei. J Gen Appl Microbiol.* 62:98-105.

sirtuin, Lactobacillus paracasei, intracellular localization

講演番号：3A04a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A04 会場

Lactobacillus paracasei における脱アセチル化酵素サーチュインの機能解析
Functional analyses of sirtuin in *Lactobacillus paracasei*
○新 穂高[1]、トーレス-バレード グレイゼル アンジェリック[1]、権田 拓弥[1]、梶川 揚申[2]、川崎 信治[3]、新村 洋一[3]、遠藤 明仁[1]、中川 純一[1] ([1]東農大　生物産業、[2]東農大　応用生物科学、[3]東農大　生命科学)
○Hotaka Atarashi[1], Glaezel Angelique Torres-Barredo[1], Takuya Gonda[1], Akinobu Kajikawa[2], Shinji Kawasaki[3], Youichi Niimura[3], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Faculty of Bioindustry Tokyo Univ. of Agric.,, [2]Faculty of Applied Biosciences Tokyo Univ. Agr.,, [3]Faculty of Life Sciences Tokyo Univ. Agr.,)

【目的】
サーチュインは NAD^+ 依存性の脱アセチル化酵素であり、真核生物においてはヒストンの脱アセチル化による遺伝子発現の抑制を行っている。原核生物においても、タンパク質の脱アセチル化を行うことで、タンパク質の翻訳後修飾に関与することが考えられる。現在までに我々は、乳酸菌である *Lactobacillus paracasei* にサーチュインが存在し、脱アセチル化活性を有することを見出した。更に、サーチュインの標的タンパク質として、タンパク質の合成に関与する 30S Ribosomal subunit Protein S4 を同定している。そこで本研究では、サーチュイン遺伝子欠損株およびサーチュインタンパク質高発現株を比較解析する事で、サーチュインの役割について、更なる解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】。
本実験では *Lactobacillus paracasei* BL23 の野生株 (以下、WT) 、サーチュイン遺伝子欠損株 (以下、⊿*sirA*) およびサーチュインタンパク質高発現株 (以下、HE) の 3 株を用いた。プロテオーム解析として、WT、Δ*sirA*、HE の 3 株のタンパク質の発現量について比較解析を行った。その結果、菌株ごとに発現量の異なるタンパク質が示された。また、菌株ごとのアセチル化レベルの違いを解析するため、抗 Acetylated-Lysine 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。その結果、WT と比べ、⊿*sirA* はタンパク質のアセチル化レベルが全体的に高く、HE はタンパク質のアセチル化レベルが全体的に低いことが示された。次に WT、Δ*sirA*、HE の 3 株の細胞分裂速度を生菌数計測によって解析した。その結果、Δ*sirA*、WT、HE の順に増殖速度が速い傾向を示す一方、Δ*sirA* 、WT、HE の順に菌の死滅速度は速いことが示された。更に、ストレス耐性能試験として、酸ストレス (pH 2.5、pH 3.0) 及び高温ストレス (60℃、70℃) 条件下における WT、⊿*sirA*、HE の 3 株の生存率について解析を行った。その結果、3 株の生存率は高温、酸両ストレスに対して HE、WT、⊿*sirA* の順に高いことが示された。
【考察】
プロテオーム解析により、サーチュインはタンパク質の発現に影響を及ぼすことが示唆され、細胞分裂速度計測により、細胞分裂にも関与し、更にストレス耐性能試験により菌のストレス応答能に関与することが考えられた。また、以前に我々はサーチュインの標的としてタンパク質の合成に関与する 30S Ribosomal subunit Protein S4 を同定しており、これらの事を合わせて考えると、サーチュインの役割として、ストレス応答や細胞分裂を含めた、タンパク質の合成制御が考えられる。

Sirtuin, *Lactobacillus paracasei*, Stress response

発表責任者：中川　純一（j3nakaga@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：3A04a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A04 会場

Lactobacillus paracasei におけるサーチュインの標的タンパク質の解析
Analysis of sirtuin target protein in *Lactobacillus paracasei*
○権田 拓弥[1]、トーレス-バレード グレイゼル アンジェリック[1]、新 穂高[1]、伊藤 昭博[2]、梶川 揚申[3]、川崎 信治[4]、新村 洋一[4]、遠藤 明仁[1]、中川 純一[1] ([1]東農大　生物産業、[2]東京薬科　生命科学、[3]東農大　応用生物科学、[4]東農大　生命科学)
○Takuya Gonda[1], Glaezel Angelique Torres-Barredo[1], Hotaka Atarashi[1], Akihiro Ito[2], Akinobu Kajikawa[3], Shinji Kawasaki[4], Youichi Niimura[4], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Faculty of Bioindustry Tokyo Univ.of Agric.,, [2]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.,, [3]Faculty of Applied Biosciences Tokyo Univ. Agr.,, [4]Faculty of Life Sciences Tokyo Univ. Agr.,)

【目的】
サーチュインは NAD＋依存性の脱アセチル化酵素であり、原核生物では、タンパク質の翻訳後修飾を行っていることが報告されている。当研究室では、乳酸菌にもサーチュインが存在することを明らかにし、標的タンパク質として 30S ribosomal subunit protein S4 を同定した。また、標的タンパク質が複数存在することが示唆された。そこで本研究では Western Blotting 及び二次元電気泳動を用いた詳細なアセチローム解析を行い、乳酸菌サーチュインの機能を解明することを目的とした。
【実験方法及び結果】
供試菌株には *Lactobacillus paracasei* BL23 野生株、サーチュイン高発現株、*sirA* 欠損株を用いた。
①一次元 Western Blotting
標的タンパク質の探索のため、抗アセチル化リジン抗体を用いた Western Blotting を行った。その結果、8 本のバンドが欠損株、野生株、高発現株の順に濃く検出された。
②二次元 Western Blotting
詳細なアセチローム解析を行うため、二次元電気泳動を用いた Western Blotting を行い、3 株の比較を行った。その結果、標的タンパク質と考えられるいくつかのスポットが確認された。その中でも、欠損株で特に顕著に検出されたスポットに対し、TOF-MS による N 末端アミノ酸配列解析を行ったところ、2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (PGM) (MW : 25.9、pI : 5.6) が同定された。
③PGM の発現量の確認
二次元電気泳動後、銀染色することで 3 株のプロテオームを比較した。その結果、3 株間に PGM の発現量の差は見られず、PGM はアセチル化レベルのみが変化したことが確認された。これらのことより、PGM がサーチュインの標的タンパク質の一つであることが明らかとなった。
【総括】
一次元 Western Blotting の結果よりサーチュインが複数の標的タンパク質を持つことが明らかとなり、二次元 Western Blotting およびプロテオーム解析の結果から PGM がサーチュインの標的タンパク質の一つであることが明らかとなった。PGM は解糖系の酵素であり、乳酸菌サーチュインが代謝に関与していることが示唆された。

Sirtuin, *Lactobacillus paracasei*, acetylome

発表責任者：中川　純一（j3nakaga@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：3A04a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A04 会場

乳酸菌の磁化による経口ワクチンデリバリーシステムの開発

Development of oral vaccine delivery system using magnetized lactic acid bacteria

○佐藤 哲[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生科)
○Tetsu SATO[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr)

【目的】乳酸菌は安全な経口摂取が可能であることから、経口ワクチンの抗原運搬体として利用する試みがある。しかし、経口投与による効果的な抗原特異的免疫の付与は容易でなく、アジュバントの併用など免疫誘導効率の改善のために様々な方法が検討されている。経口免疫誘導が低効率である理由の一つに、経口摂取した抗原の大部分が腸管粘膜組織を通過してしまう点が挙げられる。したがって、抗原を腸管内へ長く留まらせることができれば、免疫誘導効率を向上させることができると考えられる。過去の研究において磁性ナノ粒子により磁化された乳酸菌を作製したことが報告された。この技術を応用することで、外部磁場によって菌体の腸管滞留時間の延長、それに伴う免疫組織との接触機会の増加が期待できる。そこで本研究を、経口ワクチンへの応用を目的とした磁性を示す乳酸菌の作製と評価を行うものとした。
【方法・結果】酸性条件下で乳酸菌と磁性ナノ粒子を結合させた。その結果、磁性ナノ粒子との結合により褐色化した菌体が磁石に集積する様子が確認されたことから乳酸菌体が磁化したと考えられた。次に、消化作用の磁性ナノ粒子への影響を調べるため、磁化させた *Lactobacillus acidophilus* NCFM を疑似消化液で処理した。その後、磁石で回収された菌数を測定したが、疑似消化液処理の前後において磁化菌数の変化はみられなかった。また、菌体上に発現させたワクチン抗原に対する磁化の影響を評価するため、菌体表層に FliC 抗原を発現する *Lactobacillus acidophilus* GAD10 を磁化し、フローサイトメーター(FACS)より菌体表層抗原を検出した。その結果、磁化処理後も菌体表層の抗原が検出され、磁化していない菌体の抗原検出量との差異はみられなかった。さらに磁化による乳酸菌体が有する免疫誘導能への影響を検討するため、C57BL/6 マウス(♀)の脾臓細胞を磁化させた乳酸菌体で刺激後、培養上清中のサイトカインを ELISA により定量した。磁化の有無による各種サイトカイン産生量に有意な差異はなかった。
【考察】疑似消化液処理の前後で磁化菌数に変化がなかったことから、磁性ナノ粒子が菌体上で安定的に保持されることが示された。また、磁化処理後も菌体表層の抗原が検出されたことから磁化による菌体表層抗原のマスキング効果は軽微であると考えられた。磁化菌体は未処理の菌体と同等のサイトカイン産生誘導能を示したことから免疫刺激活性も維持されることが明らかとなった。現在、動物実験による磁化乳酸菌の免疫誘導効果について評価をおこなっている。

Magnetic nanoparticles, Magentic LAB, Vaccine delivery system

講演番号：3A04a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A04 会場

コリネ型細菌における ECF シグマ因子 σ D の レギュロンの同定
Identification of the σ^{D} regulon in *Corynebacterium glutamicum*

○豊田 晃一[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大)
○Koichi TOYODA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】シグマ因子は RNA ポリメラーゼホロ酵素におけるプロモーター認識に関わるサブユニットである。extracytoplasmic function (ECF)シグマ因子ファミリーに属するものは、様々な環境ストレス応答に関与することが知られている。アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のゲノム上には 5 つの ECF シグマ因子 σ^{C}、σ^{D}、σ^{E}、σ^{H}、σ^{M} がコードされており、各シグマ因子の認識プロモーター、標的遺伝子（レギュロン）およびそれらの生理学的機能について報告がなされているが[1-4]、σ^{D} については未解明な点が多い。本研究では σ^{D} のレギュロンの同定により、σ^{D} 認識プロモーター配列および生理学的機能の同定を目的とした。

【方法と結果】ChIP-chip 解析によりゲノム上の σ^{D} 結合領域を同定するとともに領域内の保存配列から σ^{D} の認識プロモーターを決定した。結合領域近傍にはミコール酸生合成遺伝子群がコードされていた。ミコール酸は Corynebacterineae 亜目に属する細菌の細胞表層に見られる分岐長鎖脂肪酸である。脂肪酸の重合、トレハロースとの結合により trehalose monocorynomycolate（TMCM）が合成された後、細胞外へ輸送され、ペプチドグリカンを覆う多糖であるアラビノガラクタンへ結合される、もしくは TMCM を元に trehalose dicorynomycolate (TDCM)が合成され、非共有結合の形でさらに外側に脂肪酸層が形成される。σ^{D} 遺伝子(*sigD*)の破壊、過剰発現により、決定した σ^{D} レギュロンの発現が減少、上昇することを確認するとともに、発現に応じて TDCM 量が変化することを示した。*sigD* 内部に検出された ChIP-chip のピークにも認識プロモーターを同定するとともに、オペロンを形成すると考えられる下流の遺伝子の発現がこのプロモーターにより誘導されることを示した。多くの ECF シグマ因子同様、この下流の遺伝子がコードする膜タンパク質が σ^{D} のアンチシグマ因子として機能することを示した。*sigD* 遺伝子破壊株はリゾチームに対して感受性となるが、これにミコール酸の生合成遺伝子並びにレギュロン内の L,D-transpeptidase の発現低下が寄与することを示した。以上より、σ^{D} は細胞表層を改変することによりストレス耐性を獲得するために機能すると考えられる。

本研究の一部は JSPS 科研費 17K15256 の助成により実施した。

1. Park SD., *et. al.*, Microbiology **154(3)**, 915-923, (2008)
2. Toyoda K., *et. al.*, J. Bacteriol. **197(3)**, 483-496, (2015)
3. Toyoda K., *et. al.*, Mol. Microbiol. **100(3)**, 486-509, (2016)
4. Nakunst D., *et. al.*, J. Bacteriol. **189(13)**, 4696-4707, (2007).

Corynebacterium glutamicum, sigma factor, mycolic acid

発表責任者：乾　将行（mmg-lab@rite.or.jp）

講演番号：3A04a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A04 会場

毒性耐性に注目した芳香族化合物生産菌の適性解析
Aptitude analysis of microorganism for producing aromatic compounds by evaluating stress tolerance
○小倉 崚司[1,2]、久保田 健[2]、乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE）
○Ryoji OGURA[1,2], Takeshi KUBOTA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】芳香族化合物の多くは原材料を石油資源に依存しているのが現状である。地球温暖化や石油資源枯渇問題を考慮した場合、より環境に負担の少ない微生物を用いたバイオプロセスによる生産が望まれる。しかし芳香族化合物は、微生物に対して生育阻害を示すことからバイオプロセスによる高生産は困難とされてきた。この課題を解決する為には、高い毒性耐性を持つ微生物の選別、化合物の作用機序を解明することが極めて重要である。

我々の研究グループは *Corynebacterium glutamicum* を用いた芳香族化合物の工業生産を目指している。昨年の報告では、*C. glutamicum* がアミノ安息香酸など、計 8 種の芳香族化合物に対して *Escherichia coli* 、*Saccharomyces cerevisiae* といった工業用生産菌に比べ高い毒性耐性を有していることを発表した。今回の報告では、*C. glutamicum* の生産宿主としての適性をより明確にするため、工業用生産菌に加え、*Pseudomonas putida* などの溶媒耐性菌や枯草菌などのモデル微生物を比較対象に加え、*C. glutamicum* の毒性耐性を相対的に評価した。

【方法と結果】*C. glutamicum*、並びに工業用生産菌、溶媒耐性菌など計 8 種を対象として、各宿主の毒性耐性を評価した。0 mM から 700 mM の範囲で化合物を培地に加え、マイクロプレートを用いて培養試験を行った。試験に用いた芳香族化合物は *C. glutamicum* の代謝系に含まれるものを中心に選出し、計 15 種類の化合物を用いた。その後、測定した OD_{600} より各化合物の増殖阻害率 50%の濃度（IC_{50}）を求めることで宿主の毒性耐性を定量化した。グラム陽性菌、グラム陰性菌、真核生物と各宿主の特性ごとに分類した後、得られたデータを基に *C. glutamicum* の毒性耐性を相対的に評価した。結果、グラム陽性菌である *Rhodococcus erythropolis*、*Bacillus subtilis* と比較した場合、*C. glutamicum* は 15 種類全ての化合物に対して最も高い毒性耐性を示した。次にグラム陰性菌である *E. coli*、*P. puitda* と比較した結果、*C. glutamicum* が 14 種類、*P. puitda* が 1 種類の化合物に対して最も高い毒性耐性を示した。真核生物である *S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* と比較した結果、*C. glutamicum* が 9 種類、*S. cerevisiae* が 6 種類の化合物に対して最も高い毒性耐性を示した。この結果より、*C. glutamicum*、並びに *S. cerevisiae* が芳香族化合物の生産菌として有望であることが示唆された。加えて、各化合物の Log P 値を求めることで、化合物の構造と毒性の強さの関係性についても解析を行っている。以上の結果を踏まえ、*C. glutamicum* の芳香族化合物耐性、化合物の作用機序について考察する。

Corynebacterium glutamicum, growth inhibition, Log P

発表責任者：小倉崚司（ogura.ryoji.on1@bs.naist.jp）

講演番号：3A04a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A04 会場

Corynebacterium glutamicum ストレス応答性遺伝子 uk3 の生物学的機能
Biological function of stress-responding gene uk3 in *Corynebacterium glutamicum*.
○川内 優輝、泉田 正太郎、夏目 亮、川崎 寿（東電大・院・工）
○Yuki Kawauchi, Shotaro Izumida, Ryo Natsume, Hisashi Kawasaki (Grad. sch. eng., Tokyo Denki Univ.)

〈背景・目的〉
グルタミン酸過剰生産時に転写量が増加する遺伝子 uk3 の機能解明

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、特定のストレスに応答してグルタミン酸を過剰生産する特性を有している。本菌によるグルタミン酸過剰生産メカニズムを解明する手がかりを得るために、非グルタミン酸生産時およびグルタミン酸生産時の転写量について網羅的に解析した結果、ストレスに応答して転写量が増加する遺伝子が 7 つ見出された。その 7 つの遺伝子は機能が未知であることから、ここではそれぞれを uk1（UnKnown1）～ uk7 と呼ぶ。これらの遺伝子の機能を明らかにする目的で、各遺伝子を欠損させた株を構築し、グルタミン酸生産性に変化が生じるか調べることにした。これまでに 3 種類の破壊株、Δuk1 株、Δuk2 株、Δuk4-6 株について遺伝子を破壊することでグルタミン酸生産性に影響が出るか調べたが、野生株と同等であった。本研究では、これまでに調べていなかった uk3 の機能についても調べることにした。

＜実験方法および結果＞
uk3 遺伝子の破壊、相補、増幅による影響

uk3 遺伝子を破壊したところ、グルコース消費量が減少してグルタミン酸生産能が低下した。uk3 破壊株を uk3 発現プラスミドで形質転換したところ、グルコース消費量およびグルタミン酸生産能が復帰した。野生株を uk3 発現用プラスミドで形質転換したところ、グルコース消費量が増加してグルタミン酸生産能が増加した。

＜考察＞
uk3 遺伝子産物は膜タンパク質？

上記の結果より、uk3 はグルコースの取り込みを促進していることが示唆された。また、アミノ酸配列より、uk3 遺伝子産物は 3 回貫通型膜タンパク質であると予測された。これらの結果から、uk3 はグルコースの取り込みに関与する膜タンパク質の活性調節因子なのではないか、と考察している。

Corynebacterium glutamicum, stress response gene, glutamic acid

講演番号：3A04a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A04 会場

コリネ型細菌におけるコールドショックタンパク CspA の発現制御解析
Regulation of *cspA* gene expression in *Corynebacterium glutamicum*
○田中 裕也[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Yuya TANAKA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。遺伝子発現の制御には RNA 結合タンパクも関与することが示されているが、*C. glutamicum* での解析は進んでいない。今回我々は RNA 結合タンパク質の CspA について発現制御を解析したので報告する。
【方法と結果】CspA は *Escherichia coli* の研究から、低温で発現誘導される RNA シャペロンであると示されている。*C. glutamicum* でも 33℃から 16℃に培養温度を低下させたところ、*cspA* mRNA 量は 25 倍の発現上昇が観察された。また、*cspA* mRNA は 33℃においても培養後期と比較して培養初期に発現レベルが高く、生育フェーズに応じた発現制御機構の存在が示唆された。様々な RNase 破壊株での *cspA* mRNA 発現量を比較したところ、*rnj* 遺伝子破壊株で野生株の 10 倍以上の発現上昇を観察した。また *rnj* 破壊株では *cspA* mRNA が安定化していることも確認した。さらにプライマーエクステンション解析から *rnj* 破壊株で新たな 5'末端が出現することを観察した。低温で培養した条件でも 5'-UTR に特異的なバンドが検出されたことから、低温下で *cspA* mRNA の 5'-UTR 構造が変化している可能性が考えられた。以上の結果から、CspA の発現が RNase J による分解制御を受けていることが明らかとなった。さらにマイクロアレイ解析により *cspA* 破壊株で発現が上昇する遺伝子が見いだされたことから、CspA がこれら mRNA の代謝に関わる可能性が示唆された。

Corynebacterium glutamicum, csp, RNA

発表責任者：田中裕也（tanakayu@rite.or.jp）

講演番号：3A04a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A04 会場

コリネ型細菌における RNase III の発現制御機構解析
Expression of RNase III regulation analysis in *Corynebacterium glutamicum*
○澤 誠人[1,2]、田中 裕也[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Masato SAWA[1,2], Yuya TANAKA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々は、産業上有用な菌である *Corynebacterium glutamicum* における遺伝子発現制御の研究をしており、特に転写後制御に注目をして解析を進めている。転写後制御を行っている酵素の一つに Ribonuclease（RNase）がある。RNase は mRNA を分解しオリゴヌクレオチドのリサイクルや mRNA の発現量の制御、ncRNA の成熟に関与している。RNase の一種である RNase III は原核生物だけでなく真核生物にも広く保存されているエンド型の RNase で、dsRNA を特異的に分解する。多くの細菌では RNase III は rRNA、少数の tRNA、ncRNA の成熟に関与している。大腸菌や枯草菌などでは RNase III の標的遺伝子やストレス応答などが解明されつつある。しかしながら、*C. glutamicum* における RNase III の発現制御機構や標的遺伝子、生体内での役割など未解明な部分が多い。そこで本研究では、*C. glutamicum* における RNase III の発現制御機構の解明を目指し、RNase III の発現誘導、制御因子の解析を行った。
【方法と結果】培地中の炭素源をグルコースと酢酸の 2 種類で培養し、炭素源の違いで RNase III の発現量に差が現れるかを検証した。加えて、細菌にとって主要な RNase である RNase E/G や RNase J の破壊株を用いて RNase III をコードする遺伝子である *rnc* 遺伝子の発現量や mRNA の安定性についても比較検討を行った。

mRNA 量を定量した結果、酢酸を添加した条件と比較してグルコースを添加した条件では、RNase III の発現量の増加が確認された。さらに、転写阻害を引き起こす抗生物質である Rifampicin を培地に加え *rnc* mRNA の安定性を観察した結果、野生株と比較して RNase E/G 破壊株では半減期が約 2 倍伸び、RNase J 破壊株では半減期が約 4 倍伸びた。

以上の結果から、RNase III はグルコースが含まれている培地で発現が誘導されていることが示された。また、*rnc* mRNA の安定性が各 RNase 破壊株で増加が確認されたことから、これらの RNase が RNase III の発現を抑制していることが推測される。

C. glutamicum, posttranscriptional modification, RNase

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：3A04a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A04 会場

コリネ型細菌におけるアスパラギン及びアスパラギン酸の代謝関連遺伝子の機能解析

Functional analysis of asparagine and aspartic acid metabolism-related genes in Corynebacterium glutamicum

○土門 晃大[1,2]、福井 郁美[1,2]、須田 雅子[2]、西村 拓[2]、豊田 晃一[2]、平賀 和三[2]、乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE）
○Akihiro DOMON[1,2], Ikumi FUKUI[1,2], Masako SUDA[2], Taku NISHIMURA[2], Koichi TOYODA[2], Kazumi HIRAGA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的・背景】 コリネ型細菌*Corynebacterium glutamicum*はグラム陽性の土壌細菌で広く分布している。本菌は、グルタミン酸生産菌として単離され、各種アミノ酸生産に広く用いられている。中でもリジンやメチオニンは産業上重要なアミノ酸であり、高生産を目指した研究が行われている。これらのアミノ酸は代謝中間体としてアスパラギン酸を経由するため、下流アミノ酸合成においてその代謝フラックスを理解することは重要である。しかしながら、コリネ型細菌のアスパラギン酸生合成経路については知見が乏しい。そこで、コリネ型細菌のアミノ酸高生産株の創製を目指した基盤情報を得ることを目的として代謝経路の解析を行っている。*C. glutamicum* R株のゲノム上にはアスパラギン酸生合成に関与する遺伝子として、オキサロ酢酸にグルタミン酸のアミノ基を転移してアスパラギン酸を生成するアスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子、フマル酸とアンモニウムイオンからアスパラギン酸を生成するアスパルターゼ遺伝子が存在する。アスパラギン酸は、このようなTCA回路の中間体を経由する他に、アスパラギンからアスパラギナーゼ（*ansA*、*cgR_2808*遺伝子）によっても生成されると推察された。
【方法･結果】 アスパラギンを単一炭素源とした最少培地上で*C. glutamicum* Rは増殖可能であった。一方で、*C. glutamicum* ATCC13032は同様の培地で増殖できなかった。このことから、*C. glutamicum* Rが細胞外アスパラギンを炭素源として利用する独自の代謝機構があると推察された。*C. glutamicum* Rのゲノムのアノテーション情報から､*C. glutamicum* ATCC13032にはない遺伝子クラスターが存在することが分かった。当該クラスター（*cgR_2807-2808-2809-2810*）は、アスパラギナーゼ遺伝子、アスパルターゼ遺伝子、そしてアスパラギンパーミアーゼ遺伝子を含んでいた。*C. glutamicum* Rのゲノム上の*cgR_2808*を破壊することでアスパラギンを利用できなくなったことから当該クラスターが細胞外アスパラギンの利用に関与することが示唆された。この経路の制御機構を明らかにするため、*C. glutamicum* Rをグルコースまたはアスパラギンを単一炭素源とした最少培地上で培養し、定量RT-PCRを行った。その結果、アスパラギンを単一炭素源とした時、当該クラスター遺伝子の発現が誘導されることが分かった。また、当該クラスターの転写制御因子と予測されるGntRファミリー転写制御因子をコードする*cgR_2807*遺伝子を破壊した菌株の増殖試験、定量RT-PCRの結果についても併せて報告する。さらに、本代謝系の生理的意義を明らかにするため、遺伝子発現解析を進めている。

Aspartase, Asparaginase, transcription factor

講演番号：3A04a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A04 会場

ヒスチジンキナーゼセンサー EvgS の活性化に対する酸化還元状態の影響

Effect of Redox Condition against Activation of EvgS, an Acid-responding Sensor of Escherichia coli

○稲田 慎也[1]、芦田 久[1,3]、内海 龍太郎[2]、江口 陽子[3]（[1]近畿大・院・生物理工、[2]近畿大・農、[3]近畿大・生物理工）
○Shinya Inada[1], Hisashi Ashida[1,3], Ryutaro Utsumi[2], Yoko Eguchi[3] ([1]Grad. Sch. of BOST. Kindai Univ., [2]Faculty of Agric. Kindai Univ., [3]Faculty of BOST. Kindai Univ.)

大腸菌が生きて腸にたどり着くためには、胃の厳しい酸性環境に対抗する酸耐性システムを必要とする。この酸耐性システムに関わる遺伝子群の発現制御系の一つとして EvgS/EvgA 二成分制御系が挙げられ、本系は膜タンパク質であるヒスチジンキナーゼセンサー（HK）EvgS と対となるレスポンスレギュレーター（RR）である EvgA から構成される。EvgS は、低 pH と高濃度の一価のアルカリ金属イオンを刺激として感知することで、自身に保存されたヒスチジン残基が ATP 依存的に自己リン酸化し、EvgA のアスパラギン酸残基にリン酸基を転移することで、酸耐性システムに関わる遺伝子群の発現制御を行う(1)。EvgS の構造をみると、細胞質内には酸化還元状態を感知する PAS ドメインが存在する。EvgS のこのドメインに変異が入り恒常的に活性化する変異体が多数報告されており(2,3)、このドメインが EvgS の活性化の制御に重要であることが示唆されている。還元状態で活性化する ArcB センサー（大腸菌の HK）では、細胞質内の PAS ドメインの構造変化が還元状態による活性化に重要であることが報告されている(4)。

そこで、本研究では、EvgS の活性化と酸化還元状態との関連を検討するために、次のような実験を行った。EvgA が、直接制御する *ydeP* 遺伝子の下流に、レポーター遺伝子 *lacZ* を挿入したレポーター株を用い、好気、微好気、嫌気条件下で培養時の EvgS/EvgA 系の活性化を測定した。その結果、酸素濃度が下がるにつれて、EvgS/EvgA 系の活性化が抑えられる現象が見出され、嫌気条件下では EvgS/EvgA 系の活性化が認められなかった。*evgS* 欠損株とその相補株の実験より、嫌気条件下で抑制される EvgS/EvgA 系の活性が EvgS に依存することを確認した。さらに、嫌気条件下での EvgS/EvgA 系の不活性化が EvgS に関わるものかどうかを検討するために、PAS ドメインへの変異で恒常的に活性化した EvgS 変異株で測定した結果、嫌気条件下で EvgS/EvgA 系 の活性化は失われなかった。このことから、嫌気条件が EvgS から下流の因子に作用するのではなく、EvgS に直接作用することが示唆された。現在、還元状態による EvgS の活性化抑制機構の解析を進めている。

(1) Eguchi & Utsumi, *J Bacteriol* , 2014, **196**, 3140-9
(2) Kato et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **22**, 1203-1209.
(3) Matthew et al, *Mol Microbiol*, 2014, **93**,911-927
(4) Alvarez et al, *J Bacteriol*, 2013, **195**, 3054-3061

Redox, Acid Resistance, EvgS

発表責任者：稲田慎也（akunoihanashiriusu@gmail.com）

講演番号：3A04a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A04 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 存在下における生育停止機構に関する研究
Mechanisms of growth cessation of the genus *Clostridium* in the presence of O_2

○赤間 拓海[1]、田島 怜[1]、鈴木 裕之[1]、岡田 拓也[1]、佐藤 拓海[2]、新村 洋一[1,2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○TAKUMI AKAMA[1], RYO TAJIMA[1], HIROYUKI SUZUKI[1], TAKUYA OKADA[1], TAKUMI SATOH[2], YOICHI NIIMURA[1,2], SHINJI KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

【 目的 】

絶対嫌気性菌は 大気 O_2 濃度が１％下でもコロニーを形成することができないという特徴を持つ。O_2 存在下で生育が阻害される原因としては呼吸鎖や活性酸素種を分解する酵素系の欠如が推測されてきたが、未だその原因は不明である。当研究チームでは、絶対嫌気性菌が O_2 存在下で生育が阻害される原因の解明を目的として研究を行っている。代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌は、低濃度の気相 O_2 濃度下では全ての O_2 を消費した後に嫌気条件下とほぼ同等の生育を開始した。また O_2 を消費する酵素の同定を試みた結果、*C. acetobutylicum* において O_2 存在下で転写誘導される mRNA とタンパク質が同定され、O_2 や活性酸素種を水へと還元無毒化する反応を触媒する複合酵素系が同定された [1)]。以上の結果から、同菌は O_2 や活性酸素種による毒性とは異なる要因によって O_2 存在下で生育を停止する可能性が示唆された。本学会では、O_2 や活性酸素種による生育停止機構の解明を目的として、*C. acetobutylicum* や他の *Clostridium* 属細菌を用いて生育停止時の生育と生理状態について解析したので報告する。

【 方法・結果 】

Clostridium acetobutylicum を嫌気条件下及び O_2 存在条件下で液体振盪培養を行ったところ、O_2 濃度に応じて異なる生育挙動が観察された。また、嫌気条件下の菌体に O_2 から生じる活性酸素種である H_2O_2 を添加し同様に培養を行ったところ、O_2 存在下で観察された生育挙動に類似する挙動が観察された。また *Clostridium* 属内における生理的応答の分布を調べるために、*Clostridium* 属のタイプ種である *Clostridium butyricum* を含む数種を用いて実験を行った結果、O_2 又は H_2O_2 処理区における生理状態に共通性が観察されたことから、これらの応答性は *Clostridium* 属内で特徴的である可能性が示唆された。現在プロテオーム解析や Flow Cytometry を用いて生育停止中の細胞の生理状態に関して解析を行っている。

１）Kawasaki et al. AEM 75:1021-1029 (2009)

Clostridium, oxidative stress, anaerobe

講演番号：3A04a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A04 会場

ビフィズス菌の O_2 高感受性に関与する原因酵素に関する研究
Purification and characterization of an enzyme involved in the hyper O_2-sensitivity of *Bifidobacterium*

○宇野 早織[1]、佐藤 拓海[2]、河上 千晴[1]、佐野 寿広[1]、横尾 有咲[1]、渡部 拓也[1]、野村 泉[3]、加納 康正[4]、鈴木 徹[3]、新村 洋一[1,2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物、[3]岐阜大応生、[4]京薬大遺伝子工)
○Saori UNO[1], Takumi SATOH[2], Chiharu KAWAKAMI[1], Toshihiro SANO[1], Arisa YOKOO[1], Takuya WATABE[1], Izumi NOMURA[3], Yasunobu KANO[4], Toru SUZUKI[3], Yoichi NIINUTA[1,2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA Bio., [2]TUA Microbiol., [3]Gifu Univ., [4]Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】

嫌気性菌の O_2 感受性メカニズムの解明を目的として、代表的な嫌気性菌である *Bifidobacterium* 属細菌を用いて研究を行っている。これまでに、１．*Bifidobacterium* 属細菌は O_2 感受性株から O_2 耐性株まで幅広く分布すること、２．O_2 感受性株は O_2 存在下で培地中に過酸化水素（H_2O_2）を生成し生育が阻害されること、３．*Bifidobacterium* 属の代表種で O_2 に感受性を示す *B. bifidum* から NADH を電子供与体として O_2 を還元する活性を有する dihydroorotate dehydrogenase (DHOD)を精製し、反応機構解析の結果、本酵素が H_2O_2 生成酵素として機能すること、などを報告してきた[1)]。本学会では、*B. bifidum* と同様にヒトの乳児腸内に棲息して腸内に広く分布することが知られる *B. longum subsp. infantis* (*B. infantis*)を供試菌として用い、本菌の O_2 高感受性に関与する原因酵素について解析を行ったので報告する。

【方法・結果】

供試菌として、O_2 に高い感受性を示す *B. infantis* JCM1222^T を用いて実験を行った。様々な O_2 濃度で生育したところ、O_2 濃度５％下での液体振盪培養において顕著な生育阻害を示した。これまでに生育試験を行ったビフィズス菌の中でも特に高い感受性を示したことから O_2 高感受性グループに分類した。*B. infantis* の無細胞抽出液を用いて O_2 代謝酵素活性を検出したところ、NADPH を電子供与体として H_2O_2 を生成する O_2 還元代謝酵素活性を検出した。本活性を指標として精製を行い、分子量が約３０kDa の酵素が精製され、本タンパク質をコードする遺伝子を同定した。本遺伝子のノックアウト株を作出して液体振盪培養を行った結果、H_2O_2 生成量が低下し、O_2 濃度５％下で生育阻害が緩和された。また O_2 耐性株に本遺伝子を導入すると、培地中に H_2O_2 の生成が検出され、生育は O_2 感受性に変化した。さらに O_2 下での遺伝子発現解析を行った結果、O_2 添加後に本遺伝子の発現量が増加し、*B. intantis* と O_2 耐性株間での O_2 代謝酵素活性を比較したところ、酵素活性に差異が観察された。
以上の結果から、精製した酵素は *B. infantis* の O_2 高感受性に関与する原因酵素と推定した。

1）Kawasaki et al. *AEM* 75, 629-636 (2009)

Bifidobacterium, anaerobe, oxidative stress

講演番号：3A04a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A04 会場

好気培養から嫌気培養への急激な転換は、酸素耐性菌 *Amphibacillus xylanus* 細胞内の遊離 Fe^{2+}を増加させる。

A rapid change of anaerobic from aerobic condition increases intracelluar ferrous in *Amphibacillus xylanus* which lacks a respiratory chain

○大野 由依[1]、木俣 真弥[1]、有馬 治人[1]、中川 遥[1]、中別府 稜[1]、吉岡 駿希[1]、石毛 太一郎[2]、兼崎 友[2]、志波 優[3]、石川 森夫[4]、藤田 信之[3]、武田 晃治[5]、吉村 悦郎[6]、阿部 晃[7]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]東農大微生物、[4]東農大醸造、[5]東農大教職課程、[6]放送大教養、[7]札幌医大医学部眼科)

○Yui OHNO[1], Shinya KIMATA[1], Haruto ARIMA[1], Haruka NAKAGAWA[1], Ryo NAKABEPPU[1], Syunki YOSHIOKA[1], Taichiro ISIGE[2], Yu KANESAKI[2], Yuh SHIWA[3], Morio ISHIKAWA[4], Nobuyuki FUJITA[3], Kouji TAKEDA[5], Etsurou YOSHIMURA[6], Akira ABE[7], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]TUA Bio., [2]TUA Genome, [3]TUA Microbiol, [4]TUA Fermantation Science, [5]TUA Edu., [6]The Open Univ. Edu., [7]Sapporo Medical Univ.)

〈背景・目的〉 酸素耐性菌は呼吸鎖を欠如し、好気条件下で生存あるいは生育する嫌気性菌である。それに対して通性嫌気性菌は呼吸鎖を有し、酸素存在下では酸素を利用して生育する嫌気性菌で、大腸菌が含まれる。*Amphibacillus xylanus* は好気・嫌気条件で同等の良好生育する酸素耐性菌で、呼吸鎖を欠如するが、細胞乾燥重量あたり、大腸菌に匹敵する酸素吸収力を有す。フラビン（FAD, FMN）は一般的に酵素タンパクに結合し機能するが、*A. xylanus* には、タンパク質非結合性フラビン（遊離フラビン）が存在し[1]、遊離 FAD 存在下での活性化されるフラビン酵素 NADH oxidase-Prx[2]、NAD(P)H oxidoreductase[3]が酸素代謝に関与している。Imlay らは、大腸菌のフラビン還元酵素遺伝子ノックアウト株と野生株の呼吸鎖への電子の流れを KCN で制御し、両株で Fe^{2+}生成を観察し、両株の DNA 損傷と菌体生残性から、大腸菌における鉄還元への遊離フラビンの関与を提案した(2002, *J. Biol.Chem*。277)。*A. xylanus* の酸素代謝系への電子制御は KCN では難しく、好気培養から嫌気培養への迅速切り替え法を確立し、本法による代謝解析を試みた。

<方法・結果>①好気培養から嫌気培養への迅速切り替え培養法：8L ミニジャーファメンターにて、好気培養（100rpm, 0.5 V/V/M）を行い、対数増殖中期に 100%N_2（100rpm, 0.5 V/V/M）吹き込み下で嫌気培養に切り替えた（完全無酸素培養）。N_2吹き込み直前、吹き込み 30 分、4 時間後の生菌数（好気平板培養法）を観察した。

② 細胞内遊離フラビン定量、Fe^{2+}の分析：遊離フラビンは菌体をフレンチプレス破砕後、超遠心、膜による分子量分画後に、HPLC 分析（ODS カラム、蛍光検出法）にて分析した。細胞内 Fe^{2+}は、RhoNox1 蛍光検出試薬にて処理後、蛍光顕微鏡 15 視野分画像を基に解析した。

A. xylanus は、0~80%酸素存在下で同等の良好生育し、完全嫌気下から好気培養への切り替えに対応して生育する。本菌は自己酸素吸収で無酸素条件を確立し、嫌気的な生育が可能である。しかし、本報告の好気培養から嫌気培養への迅速切り替えでは、生育阻害が観察された。切り替え培養後 30 分では生菌数に変化はなかったが、生菌数は 4 時間後に 1／30 に減少し、切り替え 30 分から 4 時間後に、蛍光検出法による細胞内 Fe^{2+}生成が観察された。現在、細胞内 Fe^{2+}生成への代謝機構を解析中である。

[1] Ohnishi, K.*et al.*, 1994, *J. Biol.Chem.* **269**, 31418. [2] Nishiyama, Y.*et al.*, 2001, *J. Bacteriol.* **183**, 2431. [3] Mochizuki, D. *et al.*, 2014, *Microbiology* **160**, 340.

ferrous, oxygen metabolism

講演番号：3A05a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A05 会場

スフィンゴモナス属細菌からの二価カチオンで駆動する新奇べん毛モーターの発見
The discovery of a novel divalent cation-driven flagellar motor from *Sphingomonas* sp.
○吉澤 北斗[1]、長縄 俊[2]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大生命科学、[2]東洋大院生命科学)
○Hokuto YOSHIZAWA[1], Shun NAGANAWA[2], Masahiro ITO[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

【背景・目的】
多くの細菌は、自らが持つべん毛を用いて生育にとって有利な環境へと移動することが知られている。べん毛は、基部体、べん毛繊維、その両者をつなぐフックの 3 つの構造で構成され、基部体は回転モーターとして、べん毛繊維はプロペラとして機能する。また基部体は回転子と固定子からなり、固定子はイオンチャネルとして働く。H^+やNa^+などの共役イオンが、固定子内に流入し固定子の立体構造が変化することで、回転子と静電的相互作用によりべん毛が回転すると考えられている。

これまで、べん毛モーターの共役イオンとして一価のカチオンである H^+、Li^+、Na^+、K^+、Rb^+が知られており、近年、新たに当研究室により *Paenibacillus* sp. TCA20 株（TCA20 株）が、べん毛モーターの共役イオンとして二価のカチオンである Mg^{2+}、Ca^{2+}を利用できることを報告した（***Sci. Rep.***, 2016）。これまで TCA20 株以外に、共役イオンとして二価のカチオンを利用する細菌は報告されておらず、べん毛モーターの二価カチオン選択機構には不明な点が多い。そこで、我々は TCA20 株が単離された鶴巻温泉の源泉サンプルから、新たに生育に Ca^{2+}要求する *Sphingomonas* sp. TCA-1 株（TCA-1 株）を単離した。TCA-1 株は TCA20 株と同様に Ca^{2+}を含む培地で活発な運動性を示したため、共役イオンとして Ca^{2+}を利用する可能性が示唆された。そこで、本研究では TCA-1 株の生理学的性質と運動性の解析を行った。TCA-1 株のべん毛モーターが共役イオンとして二価カチオンを利用する細菌であれば、二例目となり、二価カチオンを利用したべん毛モーターの共役イオン選択機構の解明に貢献することが期待される。

【結果・考察】
生理学的性質および運動性を調べるため、様々な濃度の Ca^{2+}環境下で生育実験及び運動性の解析を行った。その結果、TCA-1 株は生育に Ca^{2+}を要求し、Ca^{2+}濃度依存的な生育が観察された。また、遊泳解析の結果も同様に、Ca^{2+}濃度依存的な運動性を示した。このことから TCA-1 株は Ca^{2+}を共役イオンとして利用していることが推察された。

【今後の展望】
現在、他の二価カチオン(Mg^{2+}、Sr^{2+}、Ba^{2+})環境下での生育及び運動性の測定を行っている。また、TCA-1 株のもつべん毛モーターのエネルギー発生ユニットである固定子遺伝子のクローニングを試み、その固定子配列の決定を試みている。

flagellar motor, calcium ion, *Sphingomonas* sp.

講演番号：3A05a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A05 会場

好アルカリ性 *Bacillus trypoxylicola* がもつ Na^+、K^+駆動型 べん毛モーター固定子のイオン選択機構の解明
Elucidation of the ion selectivity mechanism of the Na^+, K^+-driven flagellar stator from Alkaliphilic *Bacillus trypoxylicola*
○長縄 俊、今澤 陸、伊藤 政博（東洋大院　生命科学）
○Shun NAGANAWA, Riku IMAZAWA, Masahiro ITO (Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

【背景・目的】細菌のべん毛モーターの基部体は固定子と回転子から構成されている。また、固定子は MotA 型と MotB 型の 2 つのサブユニットが複合体を形成しイオンチャネルとして機能している。固定子の種類としては、H^+駆動型固定子 MotAB、Na^+駆動型固定子 MotPS、PomAB が知られている。好アルカリ性 *Bacillus alcalophilus* (BA 株)は、Na^+、K^+駆動型固定子をもつ初めての報告例であり、BA 株以外に Na^+、K^+駆動型固定子をもつ細菌は報告されていない。固定子の共役イオン選択性には、MotB 型（MotS、PomB）サブユニットが特に重要であると考えられているが、詳細については未だ不明な点が多い。MotB 型サブユニットの膜貫通領域の中ほどにイオン選択性に重要と考えられるアミノ酸残基が保存されており、Na^+駆動型ではロイシン残基が高度に保存されている。しかし、Na^+、K^+駆動型である BA 株の MotS では同じ位置にロイシン残基ではなくメチオニン残基が位置しており、このメチオニン残基が共役イオンとして K^+を選択するのに重要であると考えられている。

カブトムシの幼虫の腸内から単離された好アルカリ性 *Bacillus trypoxylicola*（BT 株）は生育に K^+を要求し、その固定子 MotPS(BT-MotPS)は、Na^+、K^+駆動型であった。BT-MotPS のアミノ酸配列を取得したところ、MotS サブユニット内のイオン選択性に重要だと考えられるアミノ酸残基の位置には Na^+駆動型に重要なロイシン残基であった。このことは、BT 株のべん毛モーターの K^+選択性には、BA 株とは異なった選択機構の存在が推定された。そこで本研究では、BT-MotP、BT-MotS サブユニットと、他の *Bacillus* 属細菌がもつ Na^+駆動型 MotP、MotS サブユニットに着目し、BT-MotPS における K^+選択機構の詳細を明らかにすることを試みた。

【結果・考察】好アルカリ性 *Bacillus pseudofirmus*（BP 株）由来の Na^+駆動型 BP-MotP、BP-MotS と、BT 株由来の Na^+、K^+駆動型 BT-MotP、BT-MotS をそれぞれ置換し、ハイブリッド固定子（BP-MotP/BT-MotS と BT-MotP/BP-MotS）を構築した。枯草菌固定子欠損株にハイブリッド固定子を発現する株（PT 株と TP 株）を作製した。作製株の遊泳解析を行った結果、ハイブリッド固定子 BP-MotP/BT-MotS は、Na^+駆動型であり、ハイブリッド固定子 BT-MotP/BP-MotS は、 Na^+、K^+駆動型であると推測された。

これまで、固定子の共役イオン選択性には、MotS サブユニットが重要であると考えられていた。しかし、 今回の実験から K^+の選択性には MotS サブユニットだけでなく、イオンチャネルを形成する MotP サブユニットにも重要な K^+選択機構の存在が示唆された。

flagellar motor, alkaliphilic *Bacillus*, Potassium ion

講演番号：3A05a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A05 会場

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株における細胞表層発現システムの構築及びその検証

Construction and characterization of cell surface layer expression system in alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4

○長澤 朋世、伊藤 政博（東洋大学）
○Tomoyo NAGASAWA, Masahiro ITO (Toyo Univ.)

【背景・目的】

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株（以後、OF4 株）は pH 7.5 ~11.4 で良好に生育する。OF4 株は、遺伝子工学的手法が開発されており、全ゲノム配列も明らかになっているため、アルカリ適応機構研究のモデル生物にもなっている。OF4 株は高アルカリ環境に適応するため、細胞表層に多量の陰荷電を含む細胞表層タンパク質の SlpA を発現し、陰荷電によるイオントラップ効果により効率よくプロトンやナトリウムイオンといったカチオンを取り込みやすくしていると考えられている。SlpA は、OF4 株の細胞表層の大部分を占めており、また、SlpA の N 末端側には、細胞表層の二次細胞壁ポリマーにアンカーされる SLH ドメインが存在する。SlpA は細胞内で産生された後、タンパク質輸送分泌系を介して、細胞外に運ばれる。その後、SlpA は細胞表層タンパク質を細胞表層で固定する酵素である CsaB のはたらきにより、二次細胞壁ポリマーと結合し、細胞表層に固定化される。本実験では、この細胞表層固定化システムを応用することで、任意の目的タンパク質を細胞表層に大量に発現させることができるか検証することを目的とした。このシステムが機能していることが検証できれば、高アルカリ性環境下で有用酵素を細胞表面に大量に固定化することができる。そして、酵素活性効率の高い好アルカリ性微生物の創製などバイオテクノロジーの分野への産業応用にも期待できる。

【操作・結果】

細胞表層に発現させる目的タンパク質として、枯草菌由来のα-アミラーゼを用いた。アミラーゼ遺伝子は *slpA* 遺伝子の SLH ドメインをコードする領域の下流に連結させた(*SLH-amyE* 遺伝子)。その後、*SLH-amyE* 遺伝子をプラスミドベクターpYM24 の IPTG 誘導プロモーター下流に導入し、プラスミドを構築した。次に、このプラスミドを OF4 SlpA 欠損株に形質転換させた株(SLH-Amy 株)を構築した。IPTG とデンプンを含む寒天培地と IPTG を含まないデンプンを含む寒天培地で培養し、ルゴール液を滴下しヨウ素デンプン反応を行った。その結果、SLH-Amy 株では、IPTG を添加した培地でのみ透明なハローが観察され、デンプンの分解が確認された。対照実験として、pYM24 を OF4 SlpA 欠損株に形質転換させた株で同様に実験を行ったところ、透明なハローは観察されなかった。

【考察と今後の展望】

SLH-Amy 株では SLH-アミラーゼ融合タンパク質を発現していると考えられる。現在、SLH-Amy が細胞表層にどの程度発現しているかを細胞上清と細胞分画に分け、アミラーゼ活性を検討している。

Bacillus pseudofirmus OF4, S-layer protein, ΔslpA

講演番号：3A05a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A05 会場

新規アラニン排出輸送体 YtfF の膜貫通領域内荷電アミノ酸の役割

Roles of charged amino acid residues present in the transmembrane segments of the novel alanine exporter YtfF of *Escherichia coli*

○勝部 哲、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大農）
○Satoshi KATSUBE, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】

我々は L-アラニン(L-Ala)を資化することができない大腸菌変異株から L-Ala を含むジペプチド(Ala-Ala)に高感受性を示す変異株を探索することによって、L-Ala 排出能を欠損した変異株を分離することに成功し、この排出能を相補するクローンを選抜して 4 つの遺伝子(*ygaW*, *ytfF*, *yeaS*, *yddG*)を同定した。このうち *ygaW* と *ytfF* はこれまで報告例のない機能未知の排出輸送体をコードする遺伝子であった。その後、各遺伝子の表現型を検討し YgaW が主要な L-Ala 排出輸送体であることが明らかとなり AlaE (alanine exporter)と命名した。一方、YtfF に関しては、L-Ala および β-Ala を排出できる輸送体であることがこれまでの研究で明らかとなったが、その生理的な機能は依然不明のままである。そこで、YtfF の役割を解明するための第一歩として YtfF の詳細な機能解析を行った。

【方法】

膜輸送体において膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸残基は機能上重要な役割を果たすことがよく知られている。そこで、膜タンパク質の膜トポロジーを予測する SOSUI で予測された YtfF の膜貫通領域に存在する 10 個の荷電アミノ酸残基に注目し、それらの電荷が保存された置換誘導体(R→K, K→R, D→E, E→D)、さらに、各荷電アミノ酸残基を中性の L-Ala に置換した誘導体を作製した。そして、これらの変異を加えた *ytfF* の各誘導体遺伝子を Ala-Ala 高感受性変異株(JW1178 Δ*alaE*)に導入した形質転換体の Ala-Ala に対する感受性(MIC)の変化を調べた。

【結果】

37 番目の Arg を Lys または Ala に変えた置換誘導体(R37K, R37A)、271 番目の Glu を Asp または Ala に置換した誘導体(E271D, D271A)において、宿主である Ala-Ala 高感受性株と同等の MIC (5 μg/ml)を示し、YtfF の機能がほぼ完全に欠損していると考えられた。また、膜貫通領域と外界の界面近くに位置する 143 番目の Glu を Asp と Ala に置換した誘導体(E143D, D143A)ではいずれも著しい MIC の低下が認められた。よって、膜貫通領域の深い位置に存在する２つの残基(R37, E271)と膜貫通領域と外界の界面近くに位置するアミノ酸残基(143E)は、YtfF の機能上重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

Escherichia coli, Alanine efflux pump, YtfF

講演番号：3A05a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A05 会場

枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾制御機構の解析

The regulation of lysine acylation of elongation factor Tu in Bacillus subtilis

○近藤 直子[1]、鈴木 祥太[1]、吉田 稔[2,3]、西山 真[1]、古園 さおり[1,2]([1]東大生物工学セ、[2]理研 CSRS、[3]東大院農生科)

○ Naoko KONDO[1], Shota SUZUKI[1], Minoru YOSHIDA[2,3], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,2] ([1]UTokyo-BRC, [2]RIKEN-CSRS, [3]UTokyo-GSALS)

タンパク質リジン残基のアシル化は進化的に保存された翻訳後修飾であり、酵素的および非酵素的な制御を受ける。我々は、枯草菌の翻訳伸長因子 EF-Tu が培養フェーズや栄養条件に応じてアセチル化とスクシニル化レベルが変化することを見出している。EF-Tu 内のアセチル化／スクシニル化部位に対する変異解析から、tRNA との相互作用に重要なドメイン 3 内のスクシニル化部位の模倣変異株では増殖遅延が見られ、また同変異が EF-Tu の翻訳活性を阻害することが *in vitro* 翻訳アッセイによって示された。一方、GTPase を担う G ドメイン内の主要なアセチル化部位の模倣変異株では増殖および翻訳活性への影響が観察されず、そのアセチル化の役割は明らかになっていない。本研究では、ダイナミックに変化する EF-Tu のアセチル化／スクシニル化制御機構の全体像を明らかにすることを目指した。

EF-Tu は *in vitro* でアセチルリン酸 (AcP)、アセチル CoA またはスクシニル CoA によって非酵素的にアシル化された。LB 培地で培養した各種破壊株から Strep タグ融合 EF-Tu を精製し、ウェスタンブロッティングでアセチル化レベルを調べた。その結果、AcP を蓄積する *ackA* 変異株でアセチル化の増加が見られたことから、AcP による非酵素的なアセチル化が *in vivo* でも裏付けられた。一方、アセチル化酵素をコードする *acuA* 欠損による EF-Tu のアシル化レベルの変化は小さく、組換え AcuA タンパク質を用いた *in vitro* アッセイでも EF-Tu に対するアシル化活性は見られなかった。従って、EF-Tu のアセチル化およびスクシニル化は非酵素的な制御が主であると考えられた。しかし、主要なアセチル化部位である K42 のアセチル化レベルについては *ackA* 変異株や *acuA* 変異株で変動が見られず、未知の機構で制御される可能性が示唆された。

枯草菌の脱アセチル化酵素として AcuC と SrtN が同定されている。*acuC srtN* 二重破壊株を LB 培地またはクエン酸培地で培養し、精製した Strep タグ融合 EF-Tu のアシル化レベルをウェスタンブロッティングで調べた結果、野生株と比較して LB 培地ではアセチル化、クエン酸培地ではスクシニル化の増加が見られた。組換え AcuC および SrtN タンパク質を用いた *in vitro* アッセイの結果、AcuC と SrtN はいずれも脱アセチル化活性を示したが、脱スクシニル化活性は SrtN のみ示した。従って、EF-Tu の脱アセチル化は AcuC と SrtN が、脱スクシニル化は SrtN がそれぞれ制御していると結論付けた。

アシル化による代謝酵素の活性調節はよく知られているが、翻訳因子については殆ど知られていない。本研究により、アシル化が栄養に応答した翻訳制御に関わる可能性が示唆される。

lysine acylation, elongation factor Tu, Bacillus subtilis

講演番号：3A05a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A05 会場

デアミナーゼと融合した新規デハロゲナーゼの特徴
Characterization of a novel dehalogenase fused with deaminase
○中鉢 千尋、佐藤 優花里、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命科）
○Chihiro CHUBACHI, Yukari SATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】有機塩素系の環境汚染物質分解細菌から見出されたハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) は、加水分解反応によるハロゲン基の水酸基への置換を介して基質をアルコールに変換する酵素であり、一般に基質特異性が広く様々な有機ハロゲン化合物を基質とすることから、環境汚染物質浄化や有用物質合成の生体触媒としての応用が期待されている (Nagata *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **99**: 9865-9881)。ゲノム解析により、多くの細菌株が HLD ホモログ遺伝子を有することが明らかになりつつある。我々は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ゲノムに N 末端側に tRNA の修飾に関与する deaminase (TadA: tRNA adenosine deaminase A) と有意な相同性を示すタンパク質 (DAM ドメイン) が融合した HLD 相同タンパク質をコードする遺伝子 (*dahX*) を見出した。本 DAM-HLD 融合型遺伝子は *Acidovorax* 近縁の *Betaproteobaceria* に属する株に分布しており、融合型タンパク質として存在することに何らかの意義があると推測される。また、DahX の HLD ドメインは既知の HLD と相同性が低く、HLD としても新規基質特異性を有すると考えられた。そこで、本研究では、(i) DahX が DAM-HLD 融合型タンパク質として存在する意義、および (ii) DahX および HLD ドメインの HLD としての特性を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】C 末端に His タグを付与した DahX および HLD と DAM の各ドメインを大腸菌で大量発現・精製し、Differential Scanning Fluorimetry (DSF) 解析を行った。DSF は、タンパク質の疎水性領域に結合する SRPRO orange とタンパク質を混合して温度上昇に伴うタンパク質の変性をモニタリングし、T_m 値を測定する手法である。その結果、DahX は二種類の T_m 値を有し、低温側は HLD ドメインの T_m 値とほぼ一致した。一方、DAM ドメインの蛍光強度は温度上昇前から高く、DAM ドメインのみだと溶液中で不安定である可能性が示唆された。一方、細菌の TadA はホモ二量体を、真核生物は ADAT2-ADAT3 から成るヘテロ二量体を形成する。ゲル濾過クロマトグラフィーにより DahX の溶液中での分子量を解析したところ、約 90%が二量体を形成し、残り 10%は単量体として存在していた。TadA 特有の FFxxxR モチーフを有する deaminase をコードする遺伝子は KKS102 株ゲノムには *dahX* のみであり、KKS102 株の *dahX* 破壊株が野生型株と比べて生育能が低下したことからも、KKS102 株およびその近縁株では DahX が大腸菌の生育には必須である TadA と同様の機能を有する可能性が高い。以上、KKS 株の新規 HLD は、生育に重要な DAM と融合タンパク質として存在することでその安定化に関わることが示唆された。現在、DahX および HLD ドメインの HLD 活性の基質特異性を検討中である。

dehalogenase, deaminase, fusion protein

発表責任者：中鉢千尋（c.chubachi@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A05a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A05 会場

代謝酵素遺伝子群の人工クラスターを利用した有機塩素系殺虫剤資化細菌の育種

Breeding of bacteria assimilating an organochlorine pesticide by using an artificial gene cluster for its degradation

○蘇 立俊、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大学・大学院生命科学研究科）
○Lijun Su, Hiromi Kato, Yoshiyuki Otsubo, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (HCH)は人工の化学物質であり、深刻な環境汚染を引き起こしている。HCH 分解細菌は、人類が HCH を環境に放出後誕生したと考えられ、実際、*Sphingobium japonicum* UT26 株を代表とする HCH 分解資化細菌は、 (i) 分解酵素遺伝子群がゲノム中に散在し、近傍に存在する挿入配列 IS*6100* の影響で遺伝的に不安定であり、HCH 分解資化能が安定維持されない、(ii) HCH 代謝過程において有毒な dead-end 産物を生じる、という HCH 代謝に対する適応が不十分であることを示唆する特徴を有していた。これら特徴は、HCH 分解細菌株の環境浄化への応用や、遺伝子キャプチャリングの宿主としての利用の際に問題となるため、天然の HCH 分解細菌より安定かつ効率的に HCH 分解資化能を発揮する組換え細菌株の育種が望まれる。そこで、本研究では、HCH 代謝に特異的に必要な遺伝子を HCH 分解能を持たない環境細菌株に導入し、HCH 分解細菌株を人工的に育種することを目的とした。
【方法・結果および考察】HCH 分解細菌は、HCH を各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物であるβ-ketoadipate を経て代謝する。多くの環境細菌が本物質の代謝能を有するため、β-ketoadipate までの代謝が HCH 分解に特異的な反応と考えられる。そこで、まず HCH をβ-ketoadipate に変換するのに必要な LinA から LinF の 6 つの酵素遺伝子クラスターを作製した。この際、HCH 初発分解に作用する LinA の活性が次段階に作用する LinB の活性より相対的に強いとより多くの dead-end 産物を生じることを考慮し、*linB* と *linA* をクラスターの先頭と最後尾にそれぞれ配置した。以前の研究で、本クラスターを *tac* プロモーター支配下に有する広宿主域性プラスミドを pentachlorophenol 分解細菌 *Sphingobium chlorophenolicum* L-1 由来株に導入することで HCH 分解資化菌が創出できる予備的知見を得ているが（日本農芸化学会 2015 年大会）、作製株での活性発現が弱かった。また、他株には本プラスミドが導入できないか、導入できても明確な代謝活性を示さないなどの問題が見られた。これら結果から、*lin* genes の発現が、高すぎても低すぎても適当な分解細菌が創出できない可能性が考えられたため、新たに、導入株における *lin* genes の発現が、 (i) 高いレベルで構成的に発現、(ii) 比較的低レベルで構成的に発現、(iii) 極めて低レベルでの発現、となることが期待される 3 種のコンストラクトを作製し、これらプラスミドをβ-ketoadipate 代謝能を有し IS*6100* を保持しない様々な環境細菌株に導入した。現在、作製株の HCH 分解代謝能について、天然の分解細菌株との比較検討を行っている。

gene cluster, organochlorine pesticide, synthetic biology

講演番号：3A05a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A05 会場

ランダム変異による超好熱菌の低温適応関連遺伝子の探索

Identification of genes related to cold adaptation in hyperthermophilic archaeon by genome-wide random mutagenesis

○大泉 翠[1]、二石 涼平[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1]([1]東工大院・生命理工、[2]立命館大・生命科学)

○Midori Oizumi[1], Ryohei Futatsuishi[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Tadayuki Imanaka[2], Toshiaki Fukui[1] ([1]Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

90℃以上の高温環境で生育可能な超好熱菌は進化系統樹において根の近傍に位置する。全生物共通祖先が超好熱菌であったとの仮説に従うと、現存の常温生物は超好熱菌の低温適応進化により生じたと考えられることから、超好熱菌における低温適応機構は生命進化の観点から興味深い。超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis*（至適生育温度 85℃）の生育下限温度は約 60℃であり、近縁の *Pyrococcus* 属の 68～85℃と比較して低い。このことから *T. kodakarensis* は超好熱菌にとって比較的低温な環境での生育に関与する遺伝子を有することが示唆される。我々は近年、*T. kodakarensis* 染色体上のランダムな位置にトランスポゾン領域を挿入する方法を確立しており、表現型による変異株スクリーニングが可能である。このランダム変異ライブラリーから至適生育温度（85℃）より低温での生育能が低下した低温感受性株のスクリーニングを行ったところ、約 1,000 株のスクリーニングから既知の低温適応タンパク質である低温誘導性シャペロニン遺伝子 *cpkA* の変異株を取得した。本研究ではさらに多数の変異株からのスクリーニングを行い、低温適応関連遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】

ランダム変異ライブラリーの作製にはウラシル・アグマチン要求性、推定制限系遺伝子破壊株Δ2239 株(Δ*pyrF* Δ*pdaD* Δ*tk2239*)を宿主とした。プレート培地上の変異体モノコロニーをピルビン酸含有人工海水栄養豊富培地（ASW-YT-Pyr）200 µl を分注した 96 穴プレートのウェルに植菌し、85℃で嫌気培養した。この培養プレートを 2 枚に複製し、それぞれ低温条件(60℃)と至適生育条件(85℃)で培養した後、マイクロプレートリーダーによる濁度測定で各ウェルの生育を判定した。85℃では良好に生育するが 60℃での生育が低下した株を低温感受性候補株とし（1 次スクリーニング)、さらに試験管培養での生育を測定することで変異株を選抜した（2 次スクリーニング)。

プレート培養条件の最適化を行い、約 3,000 株のスクリーニングを行ったところ、新たに 1 株の低温感受性株を取得した。この取得率の低さから *T. kodakarensis* において低温適応に関与する遺伝子は少数である可能性が示唆された。変異株のゲノム DNA からトランスポゾン転移領域を大腸菌にレスキューしたプラスミドを取得し、塩基配列を決定することで変位部位を同定した。その結果、糖ヌクレオチド代謝への関与が推定される遺伝子が変異部位として同定された。本遺伝子と低温感受性の関連性を示すために、現在遺伝子相補株の解析などを進めている。

hyperthermophile, random mutagenesis, *Thermococcus kodakarensis*

講演番号：3A05a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A05 会場

冬虫夏草サナギタケ（*Cordysceps millitaris*）の各交配型における比較ゲノム解析

The comparative genome analysis in different mating types of *Cordysceps millitaris*.

○鈴木 智大[1]、鈴木 貴也[2]、崔 宰熏[3,4]、小野 晶子[1]、河岸 洋和[3,4]、道羅 英夫[2,4] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・理、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研)

○ Tomohiro SUZUKI[1], Takaya SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[3,4], Akiko ONO[1], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Hideo DOHRA[2,4] ([1]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [2]Department of Science, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology Shizuoka University)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されており、その 1 種である *Cordyceps militaris* (サナギタケ)は鱗翅目昆虫の蛹の病原体である。現在までにサナギタケは MAT-α型および MAT-HMG 型の交配型が存在することが確認されているが、そのゲノム情報が解読されているのは MAT-α型のみである[1)]。そこで本研究では、各交配型に特異的なゲノム構造を明らかにすることを目的とし、サナギタケから単離した各交配型のゲノム解読および比較ゲノム解析を行った。

【方法及び結果】

NBRC に登録されているサナギタケ全 18 株の交配型を決定するために、交配型遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行い、交配型の確認を行った。得られた結果から、異核共存体（NBRC103759 株および NBRC100741 株）を選抜し、各単相株を取得後、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いたゲノムシークエンスを行った。 取得したリードを用いて SPAdes によるアセンブリとスキャフォールディングを行い、相補的な交配型の計 4 株のドラフトゲノム配列を決定した。更に交配型におけるゲノム構造・遺伝子レパートリー相同性の比較および RBM（reciprocal best matches）を用いた各交配型・株間特異的な遺伝子を同定した。現在、同定した各交配型に特異的な遺伝子のリアルタイム PCR を用いた発現定量など、より詳細な解析を行っている。

1）Zheng P., et al., Genome Biol, 1, R116.（2011）

comparative genome analysis, *Cordyceps militaris*, mating type

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A05 会場

冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンが宿主への感染に及ぼす影響の検討

Effect of a lectin from the mushroom *Cordyceps militaris* on host.

○小野 晶子[1]、柏 毅[2]、本山 高幸[2]、崔 宰熏[3,4]、平井 浩文[3]、道羅 英夫[3]、長田 裕之[2]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[5] ([1]宇都宮大・農、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[3]静岡大・グリーン研、[4]静岡大・農、[5]宇都宮大・バイオ)

○Akiko ONO[1], Takeshi KASHIWA[2], Takayuki MOTOYAMA[2], Jae-hoon CHOI[3,4], Hirofumi HIRAI[3], Hideo DOHRA[3], Hiroyuki OSADA[2], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[5] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [3]Research Institute of Green Science and Technology Shizuoka University, [4]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [5]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

【目的】冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約 500 種が確認されている。その 1 種である *Cordyceps militaris* はサナギタケと呼ばれ、東アジアにおいて中国医学で癌患者の治療薬として古くから用いられてきた。しかし、この菌の感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究ではサナギタケ由来レクチン（*C. militaris lectin*、CML）が、感染・寄生・子実体形成における菌と昆虫との相互作用に関与しているのではないかという仮説のもと、現在までに CML の精製・諸性質決定、カイコ中の CML に結合する物質の探索を行った。その結果、CML の一次アミノ酸配列・諸性質を決定し、CML がカイコ中の Sex-specific storage-protein 2（SP2）に結合することを見出した。そこで本研究では、(1) 酵母（*Kluyveromyces lactis*）を用いた CML の異種発現系を構築し、その諸性質をより詳細に決定することと、(2) 異種発現させた rCML をカイコの蛹に接種しその影響を調べることで、サナギタケの感染から子実体形成に至る過程での CML の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】サナギタケ子実体より total RNA を抽出・精製した後に逆転写反応により cDNA を合成し、*cml* 遺伝子のクローニングを行った。*K. lactis* Protein Expression Kit を用いて *K. lactis* GG799 株のゲノムに導入し、形質転換体を取得した。得られた酵母形質転換体を YPGal 培地で培養後、培養上清を His Trap HP アフィニティークロマトグラフィーに供することで精製 rCML を得た。取得した精製 rCML を SDS-PAGE に供したところ、目的の 15 kDa 付近にシングルバンドが確認された。更に赤血球凝集活性試験および赤血球凝集反応阻害試験の結果から rCML はおよび糖認識能を有していること、その糖認識特異性は native CML と同等であることが明らかになった。また、取得した rCML をカイコ蛹に接種し、羽化率の算出によりカイコ蛹への感染に及ぼす影響を検討した。その結果、rCML を接種したカイコ蛹では対照区（PBS 接種区）と比較して有意にカイコの蛹の羽化を促進することが明らかになった。現在 *cml* 遺伝子の破壊株の作成と、その表現型の確認を試みている。

1) Yue.K., et al,. *J Pharm Pharmacol*, 65:474-493 (2013)

Cordyceps militaris, lectin, infection process

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A05 会場

スギヒラタケに特異な化合物(pleurocybellaziridine)の生合成経路に関する化学的研究
The chemical investigation on biosynthetic pathway of pleurocybellaziridine, a specific compound for *Pleurocybella porrigens*.

○手塚 裕紀[1]、安重 伸太郎[2]、大庭 亨[2]、崔 宰熏[3,4]、二瓶 賢一[1]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[1,5] ([1]宇都宮大・農、[2]宇都宮大・工、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研、[5]宇都宮大・バイオ)
○Yuki TEZUKA[1], Shintaro ANJU[2], Toru OBA[2], Jae-hoon CHOI[3,4], Ken-ichi NIHEI[1], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[1,5] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Faculty of Engineering, Utsunomiya University, [3]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [5]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

【目的】

2004 年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は 59 名に達し、17 名の患者が亡くなった。そのうち 59 例中 55 名はスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）を摂取しており、51 名が腎機能障害を持っていた。このことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は完全な解明には至っていない。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列および cDNA 塩基配列情報の取得に成功しており [1)]、PPL とスギヒラタケ致死性高分子(B3)を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している [2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに毒性を示す pleurocybellaziridine（PA）の単離にも成功している [3)]。そこで本研究では本化合物の生合成経路の解明を目的とし、スギヒラタケ菌糸体からの PA の検出および定量を試みた。

【方法・結果】

スギヒラタケ菌糸体（NBRC 30334 および NBRC30384）を 25℃で 8 週間前培養し、菌糸体を回収・破砕した後、メタノールで 4℃、3 時間抽出し粗抽出液を得た。得られたメタノール抽出物をジフェニルジアゾメタンで処理した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて部分精製を行った。その後、LC-MS/MS(TripleTOF 5600+)を用いてジフェニルメチルエステル化された PA の検出を試みた結果、スギヒラタケ菌糸体中にも PA が存在することが明らかとなった。次いでメタノール抽出物を直接 LC-MS/MS に供することで PA の定量を試みた。その結果、両菌株の粗抽出液において化学合成した PA と一致した溶出時間および MS/MS スペクトルが得られ、菌糸体中でも PA は豊富に存在することが明らかとなった。現在、培養した菌糸体に推定前駆体を添加するなど、PA 生合成経路解明に向けた検討を行っている。

Pleurocybellaziridine, mushroom, *Pleurocybella porrigens*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A05 会場

マコモタケの共存・不稔の分子機構解明

Analysis of the molecular mechanism of coexistence and sterility of Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*.

○丸田 瞳[1]、謝 肖男[2]、崔 宰熏[3,4]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[2]（[1]宇都宮大・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研）

○Hitomi MARUTA[1], Xiaonan XIE[2], Jae-hoon CHOI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[2] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [3]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

イネ科の植物であるマコモ（*Zizania latifolia*）に、黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染すると茎部に異常な肥大が生じる。この肥大した茎部は菌えいと呼ばれ、マコモタケと称する。マコモタケは、花芽が形成されず実がならない。菌が感染し植物にこぶ状の組織を作る例は数多あり、その組織肥大を惹起するのはほとんどの場合インドール酢酸（IAA）であることが定説である。そこで本研究では、マコモタケ（植物-菌共存体）の共存・不稔の分子機構の解明を目的とし、1)不稔・共存に関わる遺伝子の網羅的解析、2)既知植物ホルモンの存在確認・作用機序解明を行う。

【方法・結果】

1) 黒穂菌の ITS(internal transcribed spacers)1 および ITS2 領域でプライマーを設計し、リアルタイム PCR を用いて黒穂菌の検出を試みた結果、黒穂菌を定量的に検出する方法を確立した。次いで、定植期から 1 か月ごとにマコモタケをサンプリングし､本方法を用いてマコモタケの各生育段階(定植期～収穫期)・各部位での黒穂菌の生育量を定量した。その結果、黒穂菌の生育が盛んな時期は分げつ盛期から分げつ停止期であることが明らかになった。現在、これら生育の盛んな時期の検体から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を行っている。

2) マコモタケより単離された黒穂菌(NBRC9887)を Czapek 培地にて 1 週間培養した。その後菌体を回収・破砕し、内部標準物質（$^{13}C_6$ IAA）を添加しアセトニトリル（1%酢酸添加）で抽出した。得られた粗抽出物を LC-MS/MS 解析に供した結果、黒穂菌は IAA を生産することが明らかになった。さらにマコモタケの菌えい部の IAA 存在量も検討した結果 IAA が検出されたが、マコモタケ菌えい部の IAA 量はその他の植物体の IAA 存在量と比較して同程度であった。現在、各生育段階の IAA 存在量の確認などより詳細な検討を行っている。

Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A05 会場

Lactococcus lactis subsp. *lactis* G50 株の細胞表層タンパク質の解析
Identification of cell wall proteins of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* G50
○鈴木 チセ[1]、中川 博之[2]、山崎 俊正[2]、守谷 直子[1]、木元 広実[1] ([1]農研機構・畜産部門、[2]農研機構・高度解析セ)
○Chise SUZUKI[1], Hiroyuki NAKAGAWA[2], Toshimasa YAMAZAKI[2], Naoko MORIYA[1], Hiromi KIMOTO[1] ([1]NARO NILGS, [2]NARO NAAC)

【目的】
沖縄の牧草から分離された乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* G50（以下 G50）は高い免疫賦活作用をもち、生菌の経口投与によりオボムコイド感作マウスの全 IgE 抗体産生を抑制する(1)。G50 生菌はマクロファージ様細胞株 J774.1 に対して TNF α の誘導活性をもつが、加熱処理によりその活性は失われる(2)。G50 の高い免疫賦活活性は細胞表層のタンパク質に起因すると想定し、G50 に特異的な細胞表層タンパク質の解析を行った。
【方法】
細胞壁をリゾチーム処理することで細胞壁タンパク質を調製し、G50 菌体に対して作成した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。抗体と反応性のあるバンドを切り出して MALDI TOFMS 解析及び Mascot サーチにより当該タンパク質の同定を行った。デリーション株は温度感受性複製を示す pG^{+}host9 を用いて作出した。
【結果】
抗 G50 抗体を用いたウェスタンブロットで抗体に強く反応する 2 本のバンドのうち 37 kDa のタンパク質は G50 ゲノムの gene_202 (*pgk*)にコードされるホスホグリセリン酸キナーゼ(以下 PGK)、100k Da のタンパク質は gene_2153 (*ywfG*)にコードされる細胞壁タンパク質(以下 YwfG)と同定された。PGK は本来解糖系の酵素であるが、細胞表層タンパク質として乳酸菌や酵母での報告がある。YwfG は 1107 アミノ酸からなり、N 末端側に L-型レクチンドメイン、続いてムチン結合ドメインが連なり、C 末端側に細胞壁アンカードメインである LPXTG モチーフを有していた。病原因子として知られている *Listeria* の internalin とはアミノ酸レベルの同一性は 27%であった。*ywfG* デリーション株のウェスタンブロットでは、抗 G50 抗体と反応する 100 kDa のバンドは検出されなかった。今後は免疫賦活活性について調べる予定である。

(1) Kimoto et al. *Microbiol Immunol.* 48(2):75-82 (2004)
(2) Suzuki et al. *Int J Food Microbiol.* 123(1-2):159-165 (2008)

Lactococcus lactis subsp. *lactis*, cell wall proteins, internalin

講演番号：3A06a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A06 会場

逆転写酵素の tailing 活性と新規 TSLR 反応を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析

Tailing activity and a novel template-switching-like reaction of MMLV reverse transcriptase for quantitative TnSeq analysis of Tn mutant library.

○大坪 嘉行、佐々木 春菜、永田 裕二、津田 雅孝（東北大学）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Sasaki Haruna, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

トランスポゾン(Tn)変異株作製法は、強力な解析手法としてこれまで様々に利用されて来た。近年では次世代シーケンサー(NGS)を利用して Tn 変異株ライブラリー中の Tn カセット挿入位置を網羅的に解析する TnSeq 法も用いられるようになってきている。ただし現在の TnSeq 法は、PCR 増幅によって NGS シーケンスライブラリーを調整するため、得られたリードの数が各 Tn 変異株の存在割合を必ずしも反映しないという点で定量性に問題がある。本研究では、Tn 変異株ライブラリー中の各 Tn 変異株がライブラリー中に占める割合を、高い定量性で検出可能な qTnSeq 法の構築を行った。
TnSeq 法に定量性を与える方策として考案した方法は、PCR 増幅前に Tn カセット含有 DNA 断片に固有の識別タグ配列を含む DNA 断片を連結する方法である。NGS 解析で得られたリードについて、同じ識別タグ配列を持つ物は元々同じ DNA 分子に由来することに基づいてデータ処理すれば PCR 増幅のバイアスによる影響を排除することができる。
超音波処理によりランダムに断片化した Tn 変異株ライブラリーDNA に識別タグ配列を含むアダプターDNA を高効率で連結する方法を模索したところ、有効な方法を見いだしたので報告する。まず我々は、広く逆転写に使われているマロニーマウス白血病ウィルス由来の逆転写酵素(MMLVRT)が平滑二本鎖 DNA 末端の 3'端に対する強い塩基付加活性を有しており、A、C、G、T のいずれについても数個を 3'突出させることができること、すなわち強い tailing 活性を有することを見いだした。またさらに、C、G、T の tailing 反応をそれぞれ特異的に促進する促進化合物を見いだした。これを使用することにより、3 個程度の C または T、4 個程度の G を付加可能である。さらには、この突出させた末端に、突出する部分と相補的な一本鎖 DNA と MMLV-RT をインキュベートすることで、あらかじめ突出させた 3'末端から、一本鎖 DNA を鋳型とした DNA 合成反応が開始することを見いだした(既知の template-switching 反応にちなみ、template-switching-like reaction: TSLR 反応と命名)。特に G-tailing 反応とそれに続く TSLR 反応はどちらも反応収率が良く、100%近くの効率で平滑末端に固有識別タグ配列を有するアダプターDNA を付加することができた。本発表では、さらに実際に Tn 変異株ライブラリーを解析した結果について、報告する。

TnSeq, NGS, MMLV-RT

発表責任者：大坪嘉行（yohtsubo@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A06a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A06 会場

トランスクリプトーム解析を用いた環境細菌 *Burkholderia multivorans* の土壌環境適応戦略の解明
RNA-seq analysis for clarifying adaptation strategies of *Burkholderia multivorans* in soil
○田上 諒、西山 依里、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大院生命）
○Ryo TANOUE, Eri NISHIYAMA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

環境細菌の研究は主に実験室系で実施され学術的に大きく貢献してきているものの、本来の棲息環境での生きざまは未だ不明である。本研究室では、モデル土壌細菌*Burkholderia multivorans* ATCC 17616株の土壌環境適応戦略を解明する目的で、IVET (*in vivo* expression technology)を用いて土壌特異的に発現する遺伝子を同定してきた(Nishiyama *et al*. Environ. Microbiol. 2010)が、本手法では当該遺伝子の網羅的同定に限界があるとともに、土壌での長期間培養の必要性のために増殖期など短い期間での細菌の挙動を調べることができない。そこで本研究ではより短期間での土壌における細菌の増殖・維持機構を解明するために、土壌から抽出したRNAを用いてRNA-seqによる網羅的な解析を行い、液体培養系と比較することで、土壌でのATCC 17616株の挙動を解析した。

閉鎖系にしたポット内の滅菌土壌へATCC 17616株を 10^6 CFU/g soilになるように植菌・培養(30℃、暗所)し、経時的に CFU 測定をした。それとともに、土壌での増殖期・定常期の土壌を液体窒素にて凍結保存し、その土壌から RNA を抽出し、RNA-seq を実施した。実験室条件の比較としてコハク酸添加最小液体培地でも同様に増殖期と定常期の菌体から RNA を抽出し、RNA-seq を実施した。

炭素源代謝に関わる遺伝子では増殖期・定常期ともに糖代謝に関わる遺伝子が多かった。抽出時期の違いとしては、増殖期ではフェニル酢酸やグリセロール、定常期にはピリミジン環やマロン酸の代謝遺伝子の転写が確認され、先行研究ではわからなかった炭素源代謝における転写時期の違いが明らかとなった。また、増殖期においては貯蔵炭素源であるγ-ポリヒドロキシ酪酸の合成遺伝子も転写されており、本土壌環境は利用可能な炭素源が十分に存在している環境だと示唆された。一方で、増殖期で窒素化合物やリン酸などの無機物代謝に関わる遺伝子の転写が確認され、炭素源とは異なり窒素やリン酸などの無機物は不足していると推測された。また、増殖期では鉄ストレスや乾燥ストレスへの耐性がある細胞外多糖合成、フザル酸耐性、一酸化窒素解毒、そして運動性に関する遺伝子群も転写されていた。これらの結果から、ATCC 17616 株にとって土壌環境は過酷であり、様々なストレスへの耐性遺伝子を転写し、適応していると考えられた。一方、土壌での定常期に転写されていた遺伝子としては、バイオフィルム合成に関わる Adhesin や付着に関わるとされる線毛の合成遺伝子が転写されていた。これより、定常期では付着などによりその場にとどまっており、増殖期と比べると土壌環境に適応していると示唆された。

transcriptomics, *Burkholderia multivorans*, soil

発表責任者：田上諒（tanoue@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A06a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A06 会場

シアノバチルスにおけるシアノバクテリア遺伝子大規模発現の試み

Attempt of large-scale expression of cyanobacterial gene in cyanobacillus

○美田 知也[1]、細村 匡太郎[1]、渡辺 智[1]、兼崎 友[2]、板谷 光泰[3]、朝井 計[1]、吉川 博文[1]([1]東京農大院バイオ、[2]東京農大ゲノム解析セ、[3]慶応大先端生命研)
○Tomoya MITA[1], Masataro HOSOMURA[1], Satoru WATANABE[1], Yu KANESAKI[2], Mitsuhiro ITAYA[3], Kei ASAI[1], Hirohumi YOSHIKAWA[1] ([1]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [2]NODAI Genome Research Center, [3]Institute for Advanced Biosciences, Keio University)

【目的】 *B. subtilis* BEST 7613 株、通称「シアノバチルス」は、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 株のゲノム内にシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノムが人為的にクローニングされた株で、かつ両ゲノムが安定に保持されている(1)(2)。しかしシアノバチルスの表現型は宿主の枯草菌に準じており、トランスクリプトーム解析の結果、シアノバクテリアゲノムが転写されていないことが示された。この宿主枯草菌が外来の異種ゲノムの発現を制限する機構の解明を目指し、まずはシアノバクテリア由来の転写装置を効率的に発現させることで、シアノバクテリア遺伝子を大規模に転写させることを目的とし、研究を行った。

【結果と考察】 シアノバチルス内ではシアノバクテリアのコア酵素及びシグマ因子の転写も起きていない。枯草菌の発現機構に即したシアノバクテリア RNAP のホロ酵素を構成する遺伝子(*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *sigA*)の誘導発現系を一括してシアノバチルスに導入したところ、顕著な生育遅延が観察された。しかし、トランスクリプトーム解析の結果シアノバクテリア遺伝子の大規模な転写誘導は引き起こされていなかった。 シアノバクテリア RNAP の発現について Western 解析を行った結果、RpoB、SigA の発現量が低いことが示された。

そこで、全ての構成因子の効率的な発現とホロ酵素形成を確立するために、上記の発現系を宿主株である *B. subtilis* 168 株で再構築することとした。シアノバクテリアの RpoB には枯草菌のレアコドンが多く含まれており、codon usage の違いが原因であると考え、シアノバクテリア RpoB のコドン改変を行った。また、シアノバクテリア SigA については転写量の低さが原因と考え、別領域への単独発現を試みた。その結果両者の翻訳量を上昇させることに成功し、枯草菌内において初めて全シアノバクテリア RNAP の発現確認が取れた。

現在、RNAP 複合体形成の有無を確かめるため、シアノバクテリアの *rpoA* に His タグを付加し、RNAP の精製を行っている。また、シアノバクテリア遺伝子のプロモーター配列を用いた、*lacZ* assay による転写の評価を行っている。確認後シアノバチルスに系を導入し、枯草菌でのシアノバクテリア遺伝子の発現抑制が、転写段階で解除されるか検証する。

(1) Itaya M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. (2005)　　(2) Watanabe et al. J, Bacteriol. (2012)

Bacillus subtilis 168, synechocystis sp. pcc 6803, synthetic biology

講演番号：3A06a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A06 会場

リター層土壌 DNA からの未知セルラーゼ遺伝子の探索
Analysis of cellulase gene from litter microbiome DNA

○織田 康太郎、藤井 克彦（山口大創成）
○Kotaro ORITA, Katsuhiko FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】

セルロースは地球上で最も豊富なバイオマスである。これまでに多くのセルロース分解微生物が土壌等から分離され、それが持つセルラーゼ遺伝子が研究されてきた。他方、実験室で培養できる微生物種は全体の 1%未満であること、また、集積培養では生育の速い種が環境試料中の major population のように見える培養バイアスが生じること、といった点が未研究のセルラーゼ遺伝子を探索することを困難にしている。そこで本研究では、リター層土壌においては既知・未知を含めたセルロース分解微生物が優占化していると仮定し、そこから集積培養を経ずに直接土壌 DNA を抽出し、DNA 配列を網羅的に解析することで未研究セルラーゼを探索した。

【実験方法】

ブナ林からリター層土壌（深さ 0-10 cm 程度）を採集し、2～5 mm サイズの落葉断片を回収した。この土壌に滅菌水を加えてブレンダー撹拌し、ペーパータオルで濾過、7,000×gでの遠心分離により微生物と土壌粒子を含む沈殿を得た。次に沈殿を Ficoll で懸濁し、分画遠心分離により微生物と土壌を分け、更に Ficoll 濃度を半分にして遠心することで水溶性腐植質が除去された微生物画分を得た。微生物画分から CTAB 法で DNA の抽出を行い、得られたゲノムを鋳型としてショットガン法によりゲノム配列を解析した。得られた配列群を BLAST 検索にかけ、糖質代謝に関連すると推定される遺伝子を選抜した。

【結果】

抽出した土壌 DNA を鋳型として、多糖分解酵素の保存領域である Carbohydrate Binding Module の特異的プライマーで PCR を行ったところ、セルラーゼを含む GH5、GH7、GH9 ファミリーのプライマーでバンド増幅が確認され、未培養種を含めて多様なセルラーゼ遺伝子が含まれていると期待された。そこで土壌 DNA をショットガンクローニング法で網羅的に遺伝子解析したところ、全遺伝子配列 105656 個のうち、41%が既知微生物種（一部植物由来を含む）、59%が未知微生物種に由来することが示唆された。この中で未研究の糖質代謝関連酵素の遺伝子と思われる配列は 25 個であり、全配列の 0.02%であった。リター層ではリグノセルロース分解に関わる微生物群衆が優占的に存在すると期待したが、その期待に反して小さい存在比率であった。

litter, soil DNA, cellulase gene

講演番号：3A06a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A06 会場

孤立飼育条件がマウスの脳及びその他臓器のトランスクリプトームに与える影響

Isolation breeding condition affects transcriptome of mouse brain and each organ

○嶋田 耕育[1]、安岡 顕人[1]、亀井 飛鳥[1]、篠崎 文夏[1]、野原 正勝[1]、豊田 集[1]、飯尾 将太[1]、阿部 啓子[1,2] ([1]地方独立行政法人　産技総研、[2]東京大学・院・農・生命科学)
○KOUSUKE SHIMADA[1], AKIHITO YASUOKA[1], ASUKA KAMEI[1], FUMIKA SHINOZAKI[1], MASAKATSU NOHARA[1], TSUDOI TOYODA[1], SHOTA IIO[1], KEIKO ABE[1,2] ([1]KISTEC. Group for Food Functionality Assessment, [2]Tokyo Univ. Graduate School of Agricultural and Life Sciences)

（背景、目的）我々は食品の機能性評価に適した脳機能または抗ストレス効果を検証する為の動物実験系の構築を目的としている。食品機能性の特徴として、医薬品とは異なる緩やかな効果を示すことがある。従って食品の機能性を評価する際に強いストレス下にあるモデルマウスではその機能性がマスクされてしまうことが懸念される。実験動物を用いた脳機能評価では食品や医薬品に関わらず社会的敗北や母子分離などによる強いストレスモデルマウスが広く使用されている。そこで我々はストレスの程度の弱いモデルマウスとして短期間の孤立飼育に着目した。短期間の孤立飼育条件による表現型は十分に解析されておらず遺伝子変動を網羅的に解析した例は少ない。今回我々は短期間の孤立飼育と集団飼育を行ったマウスを用いて各臓器の網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、飼育条件に感受性の高い器官の探索と変動遺伝子群の解析を試みた。

（結果・考察）6 週齢 C57BL/6J 雄マウスを用いて短期間の孤立飼育あるいは集団飼育という 2 群を得た。飼育期間終了後、大脳皮質、海馬、線条体、扁桃体、視床下部、視床上部、肝臓、十二指腸、回腸、白色脂肪、褐色脂肪、筋肉、精巣から Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA より mRNA library 及び Small RNA library を作成し、次世代シークエンサーにより遺伝子発現を解析した。各臓器において集団飼育群と孤立飼育群の間で発現変動する mRNA 及び miRNA を抽出したところ扁桃体、視床上部、視床下部、筋肉、白色脂肪、十二指腸で発現変動する mRNA が多く確認された。miRNA の変動は扁桃体及び白色脂肪で多く確認された。mRNA と miRNA の変動が多かった扁桃体領域において遺伝子ネットワーク解析を実施し、発現変動が確認された mRNA 群と一部の miRNA は相互作用によって調節されていることが確認された。

以上より孤立飼育という条件下では特に脳領域で mRNA と miRNA の相互作用を伴い鋭敏に反応しうることが示唆された。

本研究（の一部）は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

breeding condition, transcriptome

講演番号：3A06a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A06 会場

日本人健常成人の食と腸内細菌叢における短鎖脂肪酸の生産パターン

Production patterns of short chain fatty acids associated with gut microbiota and dietary habits in healthy Japanese adults

○内川 彩夏[1]、田中 優[1]、余田 美沙子[1]、百田 理恵[1]、池田 温子[2]、河口 礼佳[2]、園元 謙二[1]、十倉 充範[2]、中山 二郎[1] ([1]九大院・農、[2]味の素（株）イノベーション研)

○Ayaka UCHIKAWA[1], Masaru TANAKA[1], Misako YODEN[1], Rie MOMODA[1], Atsuko IKEDA[2], Hiroka KOGUCHI[2], Kenji SONOMOTO[1], Mitsunori TOKURA[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Ajinomoto Institute for Innovation)

[背景・目的] 腸内細菌の多くは、宿主によって消化されない難消化性食物をエネルギーとして利用し、その分解産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸を生成する。この短鎖脂肪酸は、他の腸内細菌によって資化されたり、宿主の腸管免疫系や腸上皮細胞の分化などに影響を与えることが知られている。世界中で食と腸内細菌叢、代謝産物に関する研究が行われているが、食習慣や腸内細菌叢は国ごとに大きく異なっており、日本人を対象とした研究が重要である。そこで我々は、日本人の健常者を対象に食習慣と腸内細菌叢、短鎖脂肪酸生産の関連性を詳細に解析することにした。
[方法] 本研究では、19～78 歳までの日本人 116 名を対象にした。被験者の糞便サンプルを回収するとともに自記式食事歴法質問票（DHQ-L）を用いた食習慣の調査を行った。糞便から抽出した全細菌の DNA を基に 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を網羅的に増幅させ、次世代シーケンサーIllumina MiSeq を用いた細菌叢解析を行った。得られた配列から Uparse パイプラインにより OTU を作成し、QIIME を用いて系統解析を行い、各被験者の腸内細菌叢を決定した。また、便中の短鎖脂肪酸測定は島津製作所 HPLC 有機酸分析システムを用いて行った。
[結果・考察] まず、被験者 116 名の腸内細菌叢は、平均で Bacteroidetes 門が 42%、Firmicutes 門が 49%でおよそ半分ずつを占有していた。細菌属レベルでは、Bacteroides 属が 32%を占めており、Fimicutes 門細菌は Blautia 属、Ruminococcus 属、Faecalibacterium 属など多様な属が存在していた。便中短鎖脂肪酸は、酢酸に次いでプロピオン酸、酪酸の順に多かった（それぞれ 25, 9, 6 μmol/g feces)。次に腸内細菌の占有率と短鎖脂肪酸組成データを用いて相関解析を行った。その結果、細菌叢多様性は酪酸量と正の相関を示した。さらに Bacteroidetes 門とプロピオン酸、Firmicutes 門と酪酸がそれぞれ強い正の相関を示した。ただし Firmicutes 門のうち、Granulicatella 属と Ruminococcus 属は酪酸と負の相関を示した。以上の結果より、Bacteroidetes 門細菌が優勢の細菌叢では、プロピオン酸生産が優先的に行われ、一部の属を除く Firmicutes 門細菌が優勢の細菌叢では酪酸生産が優先されることを見出した。さらに食事との関連性を調べた結果、麦飯を摂取する被験者は白米のみを摂取する被験者と比較して細菌叢多様性および Firmicutes 門の占有率が高く、プロピオン酸の割合が減少し、酪酸が増加する傾向が見られた。

gut microbiota, short chain fatty acid, dietary habit

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A06a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A06 会場

日本人健常人の腸内細菌叢における胆汁酸代謝に関する研究

Studies on bile acid metabolism in intestinal flora of healthy Japanese adults

○余田 美沙子[1]、田中 優[1]、内川 彩夏[1]、百田 理恵[1]、池田 温子[2]、河口 礼佳[2]、園元 謙二[1]、十倉 充範[2]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]味の素(株)・イノベーション研)
○Misako YODEN[1], Masaru TANAKA[1], Ayaka UCHIKAWA[1], Rie MOMODA[1], Atsuko IKEDA[2], Hiroka KOGUCHI[2], Kenji SONOMOTO[1], Mitsunori TOKURA[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Ajinomoto Institute for Innovation)

【背景】近年、腸内細菌が生産する代謝物が宿主の健康に多大なる影響を与えることが明らかになってきた。胆汁酸は肝臓でコレステロールから生合成され、これを一次胆汁酸と呼ぶ。さらに腸内細菌の働きにより二次胆汁酸へ代謝される。これらの胆汁酸には多様な分子種が存在し、その生理的作用は異なる。胆汁酸と腸内細菌叢、宿主との関連性は、最近の研究で大腸がんや炎症性腸疾患との関連性が指摘されている一方で、健常なヒトにおける胆汁酸と腸内細菌叢の関連性を明らかにした報告はされていない。そこで、健常者の便中の胆汁酸と細菌叢の関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法】本研究は、116 名の日本人健常者を対象にし、糞便サンプルを 1 ヶ月おきに 2 度にわたり回収した。各被験者の腸内細菌叢プロファイルは、糞便サンプルから抽出した全細菌 DNA を鋳型にし、16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を解析することにより取得した。便中の胆汁酸量は、凍結した糞便サンプルからエタノールにより抽出し、LC-QMS を用いて定量分析した。さらに、胆汁酸代謝に関連する鍵酵素遺伝子の抱合胆汁酸脱抱合酵素(BSH)、脱水酸化酵素 baiCD、異性化酵素 7β-hydroxysteroid dehydrogenase について、予測メタゲノム(piphillin)による相対定量解析および定量 PCR 解析を行った。
【結果と考察】日本人健常者の胆汁酸組成は、抱合型胆汁酸が多いタイプ (Con-type)、一次胆汁酸およびウルソデオキシコール酸が多いタイプ (Pri-type)、二次胆汁酸が多いタイプ (Sec-type) の 3 つの群にクラスター分けされた。約 7 割のサンプルが Sec-type であり、続いて約 2 割が Pri-type、Con-type は約 1 割程度であった。Sec-type は *Clostridia* 綱に属する *Ruminococcus* や *Lachnospira* などが多く定着し、細菌叢多様性が高い細菌叢であった。Pri-type は *Clostridia* 綱が減り多様性も減おり、*Bacteroides* が最優勢となっていた。Con-type は肉類を多く摂取する人に多く、総胆汁酸量が多く、BSH が少なく、*Fusobacterium* や *Enterobacteriaceae* 科に属する細菌が多かった。以上、日本人健常者の腸内細菌叢において、(1) *Clostridia* 綱と *Bacteroides* 属細菌を優占種とした Sec-type を基本とし、(2)総胆汁酸量が多くなると多様で二次胆汁酸変換菌の *Clostridia* 綱細菌が減り、(3)さらには dysbiosis 様の抱合型胆汁酸が多く排泄される細菌叢になることが観察された。

Gut microbiota, Bile acids, Healthy Japanese adults

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A06a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A06 会場

日本人乳幼児の生後 3 年間の腸内フローラの形成・成熟化と胆汁酸代謝の関連性解析
Development and maturation of gut microbiota in infancy and bile acids metabolism
○田中 優[1]、實藤 雅文[2]、諸隈 誠一[2]、余田 美沙子[1]、百田 理恵[1]、園元 謙二[1]、加藤 聖子[3]、中山 二郎[1] ([1]九大院・農、[2]九大・環境発達医学研究センター、[3]九大・医)
○Masaru TANAKA[1], Masafumi SANEFUJI[2], Seiichi MOROKUMA[2], Misako YODEN[1], Rie MOMODA[1], Kenji SONOMOTO[1], Seiko KATO[3], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ. Agr., [2]Kyushu Univ. Research Center For Environment and Developmental Medical Sciences, [3]Kyushu Univ. Med.)

【背景】乳児の腸内フローラは誕生直後に形成が始まり、2 年から 3 年かけて成熟していくと考えられている。この腸内フローラ形成は、乳幼児期の健康だけではなく、後の宿主の生理にも影響していることが明らかになりつつある。しかし、この腸内フローラの形成・成熟化は細菌叢組成の解析が進められているが、その機能、特に宿主との相互作用については未知の部分が多い。特に宿主の生理に重要な働きをする胆汁酸は、腸内環境を大きく左右させるが、腸内フローラの成熟化とそれによる胆汁酸代謝の変動、そしてそれが宿主の代謝恒常性に与える影響について興味が持たれる。そこで、本研究では、乳幼児の生後 3 年間の腸内フローラの形成・成熟化と胆汁酸代謝の変動の関連性を明らかにすることを目的にした。

【方法】11 名の新生児とその母親を対象とし、母親からは出産前、新生児からは生後 1、3、6、12、24、36 ヶ月時に糞便サンプルを回収した。腸内フローラは便サンプルより抽出した全細菌 DNA を鋳型とし、16S rRNA 遺伝子 の V1-V2 領域の配列を解析した。便中の胆汁酸量は凍結乾燥した糞便サンプルからエタノールにより抽出し、LC-QMS により定量分析を行った。

【結果と考察】生後 3 年までの便中の胆汁酸組成は、抱合胆汁酸型、一次胆汁酸型、二次胆汁酸型、ウルソデオキシコール酸(UDCA)型のいずれかの胆汁酸種が特徴的である 4 つの群にクラスター分けされた。生後初期は抱合胆汁酸型の乳児が多く、次いで一次胆汁酸型に変化し、離乳食開始とともに UDCA 型に変化し、その後、二次胆汁酸型へと移行する傾向が見られた。抱合胆汁酸型の乳児の腸内フローラは他と比較して *Bifidobacterium* がほとんど存在せず、*Bifidobacterium* の定着を機に胆汁酸代謝が開始されることが示唆された。一次胆汁酸型から UDCA 型への移行時には、*Ruminococcus gnavus* の優占化が見られた。UDCA は宿主に胆汁酸分泌を促進させ、脂質の消化・吸収を向上させることが知られており、また、*R. gnavus* は栄養失調児の便を移植したモデルマウスの成長を回復させることが報告されている。以上より、*R. gnavus* の定着は乳幼児の成長に重要な働きを担っていることが予測される。最終的（生後３年時）には、１名を除いたすべての乳幼児に二次胆汁酸型が観察された。二次胆汁酸型では、多様な *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門を優占菌とする成人型腸内フローラが形成されていた。以上、乳幼児期の細菌叢の成熟化が胆汁酸代謝と密接に関連している様子が伺えた。

gut microbiota, bile acids, infant

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A06a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A06 会場

「クテドノバクテリア（綱）」のゲノム解析が明かにした新規二次代謝産物生合成の潜在能力
Genome mining reveals novel natural products biosynthetic potential of the class Ktedonobacteria

○鄭 宇[1]、豊田 敦[2]、水口 洋平[2]、王 瓊渼[1]、酒井 康輝[1]、阿部 敬悦[1]、横田 明[1]、矢部 修平[1]（[1]東北大農、[2]国立遺伝学研究所）
○Yu ZHENG[1], Atsushi TOYODA[2], Yohei MINAKUCHI[2], Ciung-Mei WANG[1], Yasuteru SAKAI[1], Keietsu ABE[1], Akira YOKOTA[1], Shuhei YABE[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NIG)

【背景及び目的】 近年、多剤耐性菌による感染症が拡大する中、創薬資源「放線菌」からの新規抗生物質の創出は急減しており、探索源の開拓が急務である。「クテドノバクテリア綱」は *Chloroflexi* 門に属する好気性細菌であり、2007 年まで既報種が僅か1種の知見の乏しい系統であった。演者らのグループは土壌や地熱地帯、堆肥から 70 株以上の多様なクテドノバクテリア株の分離に成功し、新たに 1 目、2 科、3 属、5 種を創設し、さらに 2 新属を提唱準備中である。驚いたことにこれらは放線菌群とは系統が全く異なるにも拘わらず共通して放線菌様の形態を示し、種々の生物活性を示すなど「放線菌」様の有益な特徴を持つ菌群であった。我々はこの菌群が放線菌に匹敵する有用菌群と成り得ると期待しており、その潜在能力を調べるため本系統のゲノム情報から二次代謝産物の生合成遺伝子群（BGC）を解析することとした。

本報では *Ktedonobacterales* 目に属する中温菌 *Dictyobacter aurantiacus* S-27 株、未分類分離株 Uno3 株とUno16 株（2 新属提唱準備中）及び好熱菌 *Thermosporothrix* sp. COM3、*Thermogemmatisporales* 目に属する高度好熱菌 *Thermogemmatispora* sp. A3-2 の 5 株のゲノムを解読し、既報 4 株と併せて計 9 株のゲノムを解析した。

【結果及び考察】 ゲノム解読は PacBio RS II/Sequel 及び Illumina HiSeq2500 を用い、アセンブリは HGAP3/4 で行い、一部 Fosmid library による Gap closing により Finishing 中である。既報のものを含め計 9 株のゲノムサイズは 5.54 Mbp から 13.66 Mbp と比較的大きく、Uno3 株は環状ゲノムが 2 つ存在した。Uno16 株とCOM3 株はプラスミドと推定される配列を有しており、本系統を宿主としたベクター系構築への応用が期待できる。これら 8 株の BGCs を antiSMASH v3.0 を用いて探索した結果、計 104 個の BGC が検出され、*Thermosporothrix* 属の 2 株は各々 19～20 個と放線菌に匹敵するほど多く存在し、一方で *Thermogemmatisporales* 属の 3 株は 3～6 個と少なく系統によって数が大きく異なった。BCGs は Type1 Polyketide Synthase (T1PKS)、T2PKS、Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)、NRPS-T1PKS、Lantipeptide、Lassopeptide、Thiopeptide、Bacteriocin 及び Bacteriocin-Lantipeptide-T1PKS-NRPS、Bacteriocin-Lantipeptide などの多様な遺伝子クラスターを含んでいた。それらは共通して既知クラスターとの相同性が極めて低く、この結果は、「クテドノバクテリア」が新規骨格の二次代謝産物の探索源として有望な菌群である事を強く示唆している。なお、本研究は科研費「若手 B」及び「先進ゲノム支援」の助成を受けて実施された。

Ktedonobacteria, Genome, BGCs

発表責任者：矢部 修平（shuhei.yabe.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A06a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A06 会場

海洋性好酸性硫黄酸化細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの遺伝子解析

Analysis of thiosulfate dehydrogenase gene from marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium

○上村 一雄、徳久 未来、金尾 忠芳（岡山大院環境生命）
○Kazuo Kamimura, Mirai Tokuhisa, Tadayoshi Kanao (Okayama Univ)

【背景・目的】海底熱水鉱床等の未開発の海洋鉱物資源からの金属回収にバイオリーチングを適用するために，海洋性好酸性硫黄酸化細菌 SH 株を単離した。バイオリーチングでは，硫化鉱石の硫黄成分がチオ硫酸に変換されて代謝されることがあるため，この細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼ（Tsd）を精製し，性質の解析を行った[1]。Tsd は，キノンを電子受容体に用いて，2 分子のチオ硫酸をテトラチオン酸に変換する活性を触媒し，0.2 M NaCl で活性化される新規な酵素であった。精製した酵素の部分アミノ酸配列から遺伝子の決定を試みたが，決定できなかったため，SH 株の全ゲノムから Tsd 遺伝子の決定を試みた。
[方法・結果] SH 株の全ゲノムを Roche のゲノムシークエンサーを用いて決定した。得られた 65 個のコンティグ配列に含まれる ORF は，GenMarkS プログラムを用いて推定した。SH 株の推定全ゲノム長は 2.91 Mbp，GC 含量は 54.3%で，2978 個の ORF が検出された。16S rRNA 遺伝子を用いた系統学分類では，SH 株は *Acidithiobacillus thiooxidans* と同定されたが，Average Nucleotide Identity 法では，*A. thiooxidans* との相同性が 82.269%であり，新種であることが示唆された。SH 株のゲノムには，1 個の RubisCO 遺伝子，2 個の SoxABXYZ 遺伝子，2 個の硫化水素：キノン還元酵素遺伝子，2 個のチオ硫酸：キノン還元酵素（Tqo)遺伝子，1 個のテトラチオン酸加水分解等，硫黄代謝関連の酵素遺伝子が検出され，化学合成独立栄養の硫黄酸化細菌であることが確認できた。HPLC-Chip/QTOF 質量分析によって得られた Tsd の部分アミノ酸配列を用いて，SH 株の Tsd をコードする遺伝子を決定した。Tsd は，29 残基のシグナルペプチドを持つ 444 アミノ酸をコードする 1283 bp の遺伝子にコードされていた。SDS-PAGE で推定された Tsd の分子量は 44 kDa であったが，遺伝子から推定された分子量は 45.9 kDa であった。SH 株のゲノムには，2 個のチオ硫酸キノン還元酵素（Tqo)遺伝子が検出されたので，この遺伝子のいずれかが Tsd ではないかと考えられたが，Tsd は Tqo ではなかった。アミノ酸配列の相同性を調べた結果，*A. caldus* や *A. thiooxidans* の外膜タンパク質ポーリンと，それぞれ 67%と 64%の相同性を示した。SH 株の Tsd 遺伝子近傍の遺伝子を解析した結果，Tsd 遺伝子は，他の *A. thiooxidans* 株には存在していない挿入断片上にコードされていた。現在，決定した Tsd 遺伝子が Tsd 活性を示すタンパク質をコードしていることを確認するために，大腸菌での遺伝子発現を試みている。[1] Sharmin et al., Biosci. Biotech. Biochem., 80, 273 (2016)

thiosulfate dehydrogenase, sulfur-oxidizing bacterium, genome sequencing

発表責任者：上村一雄（kamimura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3A06a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A06 会場

エタノール生産性細菌 *Zymomonas mobilis*CP4 の耐熱化株における有効な変異
Effective mutations in thermal-adaptation mutants of ethanologenic *Zymomonas mobilis*CP4
○加藤 舜[1,2]、白丸 優貴[2]、山下 舞子[1,3]、村田 正之[1,2,4]、松谷 峰之介[1,2,4]、高坂 智之[1,2,4]、山田 守[1,2,4] ([1]山口大院創成科学、[2]山口大農、[3]山口大院医、[4]山口大中高温微生物セ)
○ Shun KATO[1,2], Yuki SHIROMARU[2], Maiko YAMASHITA[1,3], Masayuki MURATA[1,2,4], Minenosuke MATSUTANI[1,2,4], Tomoyuki KOSAKA[1,2,4], Mamoru YAMADA[1,2,4] ([1]Life Sience, Graduates school of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]Graduates school of Medicine, Yamaguchi Univ., [4]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ.)

[目的]
耐熱性のエタノール生産性微生物による高温発酵は、冷却コストの削減や発酵操作の簡便化などの面から安価なエタノール生産を可能にすると期待されている。我々は、生育速度が速くエタノール発酵効率が良いグラム陰性通性嫌気性細菌 *Zymomonas mobilis* のうち、CP4 株を親株として、高温で継代培養を繰り返す適応育種により、生育限界温度が 2 ºC 向上した耐熱化株 Z4-80a、Z4-80b、Z4-80c、Z4-80d を単離し、それぞれのゲノム上の変異箇所を同定してきた。本研究では耐熱化株の個々の変異の耐熱化への寄与を明らかにするため、それぞれの変異を別々に親株のゲノムに導入した変異導入株を構築し、個々の変異の効果を検討した。
[方法・結果]
それぞれ独立に適応育種を行って獲得した耐熱化株 4 株に蓄積した変異を、次世代シーケンスとサンガー法によるダイレクトシーケンスで解析したところ、シグナル伝達、膜の安定化、核酸合成、転写や膜輸送などに関わる遺伝子にそれぞれ 2–5 箇所、4 株合計で 13 箇所の変異が確認された。これらの変異のうち、耐熱化に直接的に寄与する変異を特定するため、親株に個々の変異を導入した変異株 13 株を作製し、耐熱性を評価した。その結果、13 変異箇所の内 2 変異箇所を除くすべての変異導入株において耐熱性の向上が観察された。一方、トランスポーター遺伝子に変異の入った 6 株のうち 2 株が耐熱性の向上が確認されず、さらに残りの 4 株も耐熱性の向上は認められたが、生育速度が他の変異導入株よりも遅いことが観察された。この結果はトランスポーター遺伝子への変異の耐熱化効果が低いことを示唆するが、もしかすると他の変異との組み合わせによってより強い効果を発揮するかもしれない。さらに、耐熱性の向上が認められた異なる変異を二つ組み合わせた変異導入株を構築し、その耐熱性を比較したところ、一つの変異導入株よりもさらに耐熱性が向上した。このことから、耐熱化に効果のあった変異を複数組み合わせることによりさらに耐熱化できると期待される。

Zymomonas mobilis, thermotolerance, genomic mutation

講演番号：3A06a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A06 会場

超並列シングルセルゲノム増幅産物の相互比較による高精度ゲノム解析法の開発
Acquisition of accurate bacterial genome by comparison of parallel single-cell genome amplification product

○小川 雅人[1,2]、西川 洋平[1]、森 一樹[2]、細川 正人[3,4]、竹山 春子[1,2,3]（[1]早大先進理工、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大ナノライフ創新研、[4]JST・さきがけ）
○Masato KOGAWA[1,2], Yohei NISHIKAWA[1], Kazuki MORI[2], Masahito HOSOKAWA[3,4], Haruko TAKEYAMA[1,2,3] ([1]Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [4]PRESTO, JST)

環境中には様々な微生物が存在しており、遺伝子資源としての活用が期待されている。一方で、多くの環境微生物について培養技術が未だ確立されていないために、ゲノム解析が困難となっている。そこで、難培養微生物に対する研究においては、微生物の培養を必要としないシングルセルゲノム解析が有用な手法となる。しかし、シングルセルゲノム解析に必須となるゲノム増幅(MDA)法では、ランダムに増幅バイアスが生じるため、シングルセルシーケンスデータから全ゲノム情報を取得することは難しい。同一菌株に由来する複数のシーケンスデータを統合することで補完できるが、多数のシングルセルゲノムデータを取得する必要がある。また、シーケンスデータの統合によって、MDA に由来するランダムなエラー配列が蓄積されるため、ゲノム配列情報の精度が低くなるリスクがある。

当研究室では、シングルセルシーケンスデータのハイスループット取得に向けて、微小液滴を用いたシングルセルゲノム並列増幅技術 sd-MDA を開発した(Scientific Reports, 2017)。当技術では、毎分約 10,000 個と高速に生成されるピコリットルサイズの微小液滴に細胞を包埋することでシングルセルを分離し、各微小液滴内で個別にゲノム増幅を行うことで、超並列的にシングルセルゲノムが増幅される。大腸菌および枯草菌をモデル微生物に用いて sd-MDA を行うことで、コンタミネーションの極めて少ないシングルセルゲノムの取得が達成されている。

本研究では、シングルセルシーケンスデータに含まれるランダムなエラー配列のクリーニングを行い、統合ゲノム情報を構築するツール(ccSAG)を開発した。本ツールは、同株由来シングルセルデータの相互比較によってランダムに生じたキメラ配列および混入 DNA 配列を除去し、クリーンな配列から統合シングルセルゲノムを構築する。sd-MDA で取得したモデル微生物のシングルセルデータを用いて本ツールをテストした結果、キメラ配列の大幅な減少および *de novo* アセンブリ結果の改善が確認された。さらに、およそ 8 サンプルのシングルセルシーケンスデータを元に本ツールで解析を行うことで、培養細菌集団から取得した抽出ゲノムと同等の高精度ゲノム配列を取得することができる。

本法の応用として、マウス腸内細菌を実サンプルとして sd-MDA および ccSAG を行うことで、2 種類の新規バクテロイデス属細菌についてカバー率 95%以上かつコンタミネーション 1.5%未満の高精度ドラフトゲノムを取得した。シングルセルゲノムの超並列増幅と相互参照ゲノム解析を組み合わせることで、環境微生物叢の網羅的かつ詳細な解析への応用が期待される。

single-cell genomics, microdroplet, bioinfomatics

講演番号：3A06a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A06 会場

圧力感受性酵母変異株の比較ゲノム解析
Comparative genomics in barosensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
○中野 絢菜、野村 一樹、高崎 真由、井口 晃徳、重松 亨、相井 城太郎、田中 宥司（新潟薬大・応生科）
○Ayana NAKANO, Kazuki NOMURA, Mayu TAKASAKI, Akinori IGUCHI, Toru SHIGEMATSU, Jotaro AII, Hiroshi TANAKA (NUPALS)

【背景】一般的な日本酒は、残存する清酒酵母等による品質劣化を防ぐために火入れを行うが、加熱によって本来の日本酒が持つ新鮮な香味が損なわれてしまう。我々は、香味成分の減少を防ぎながら非加熱的に微生物の殺菌ができる高圧処理を利用した新たな日本酒醸造技術の開発を進めている[1]。この技術を実用化する上で、処理圧力が低いほど装置コストも低下するため、圧力感受性酵母を用いた醸造工程の開発が望ましい。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KA31a 株（一倍体の野生株）に紫外線を照射することで圧力感受性変異株 a924E1 株を単離した[2]。本研究では、変異部位を同定し圧力感受性の遺伝的原因を解明するために、a924E1 株と KA31a 株との全ゲノム比較解析を行った。圧力感受性を引き起こす遺伝的原因を解明することで、圧力感受性酵母の育種の効率化に寄与することを本研究の目的とした。
【方法】次世代シーケンス（NGS）解析により、KA31a 株の塩基配列を取得後、清酒酵母（きょうかい酵母 7 号）の配列を参照し *de novo* アセンブリを行った。作成した KA31a 株のドラフト塩基配列（参照配列）に対して、圧力感受性変異株 a924E1 株の NGS 解析より得られたリード配列を、Burrows-Wheeler Alignment tool (BWA)を用いてマッピングした。その後、多型検出・データ抽出ソフト SAMtools を用いて、リード配列が参照配列と異なる変異部位の候補を抽出した。さらに、変異検出ソフト Unified Genotyper により変異情報の絞り込みを行うことで、紫外線照射に起因する変異の検出を試みた。
【結果】NGS 解析により得られた KA31a 株のドラフト塩基配列を参照配列とした *in silico* 解析の結果、a924E1 株において少なくとも 5 つの SNPs（一塩基多型）と 42 の indels（挿入・欠失）の存在が示された。見出された 5 つの SNPs のうち 4 つがミスセンス変異であり、残り 1 つがサイレント変異であった。a924E1 株の変異部位の候補として示唆されているミトコンドリア DNA の *COX1* 遺伝子領域について詳細な解析を行ったところ、当該領域において 10 kbp 程度の大きな欠失が生じていることが示された。
本研究は生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて行った。
[1] Nomura and Iwahashi, Rev. Agri. Sci., 2014.
[2] Shigematsu *et al.*, J. Food Sci., 2010.

barosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, comparative genomics, *COX1*

発表責任者：中野絢菜（ayana_nakano@nupals.ac.jp）

講演番号：3A06a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A06 会場

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株の環境汚染物質分解の効率化

Improvement on the degradation activity to environmental pollutant by *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○村上 将和[1]、高 未麗[1]、松村 吉信[1,2]（[1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST）
○Masakazu MURAKAMI[1], Miryo KOH[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2]（[1]Kansai University・Department of Life Science and Bioengineering, [2]Kansai University・ORDIST）

【背景】ポリカーボネート樹脂などの原料であるビスフェノール A （BPA）は、内分泌撹乱物質として生態系に悪影響を及ぼすことが危惧されている。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、本菌株が BPA 以外にもビスフェノール類化合物やビスフェニル類、有機塩素系化合物なども分解できることから、広範な環境汚染物質分解菌として活用できるものと考えている。これまでの研究で、BPA 分解関連遺伝子 *bisdAB*、*adh*、*lsd*、*bisdF*、さらに有機塩素化合物分解に関わる *had* がプラスミドの一つである pBAR1 にコードされていることを明らかにした。一方、AO1 株から BPA 分解能を失った AO1L 株が単離され、AO1 株の分解能の不安定性が実用化への障害となっており、pBAR1 の遺伝子構造の不安定性がその一因であることも確認された。本研究では、次世代シーケンサーを用いて AO1 株のゲノム構造、AO1L 株の変異領域の特定を行い BPA を含む環境汚染物質分解関連遺伝子の特定と環境汚染物質分解能の向上並びにその安定化を目的とした。

【方法と結果】AO1 株のゲノム DNA を、次世代シーケンサー（PacBio RSⅡ）を用いて解読し、Hierarchical Genome Assembly Process 3 で解析した結果、6 個の環状化 DNA に集約され、Chromosome 1 (約 3.7 Mbp)と、Chromosome 2 (約 0.96 Mbp)、Plasmid 1 (約 260 Kbp)、Plasmid 2 (110 Kbp)、Plasmid 3 (pBAR1) (80 Kbp)、Plasmid 4 (66 Kbp) で構成されていた。そして、RAST server (NMPDR) で遺伝子機能を予測したところ、70 個の芳香族化合物分解関連遺伝子が推定され、BPA 代謝中間体 4-Hydroxybenzoate (4-HBA) は *pobA* (Chromosome 2) と *bisdF* (pBAR1) にコードされた 4-HBA monooxygenase によってプロトカテク酸に変換後、β-ケトアジピン酸経路でアセチル-CoA とサクシニル-CoA に変換されるものと予想された。また AO1 株を L 培地と BPA を含む L 培地で培養し、トランスクリプトーム解析を行なった。その結果、pBAR1 内の BPA 分解関連遺伝子は BPA 存在時に顕著な発言誘導が確認されたが、Chromosome 2 の BPA 分解関連遺伝子の発言は非常に低いものであった。次に、AO1L 株のゲノム DNA を次世代シーケンサー (Miseq) を用いて解読し、AO1L 株のリーシーケンス解析を行なった。その結果、pBAR1 と Plasmid 4 内の BPA 分解関連遺伝子が欠失していることが判明した。今後は引き続き AO1 株の遺伝子の解析による AO1 株の分解能の不安定化の要因と BPA 分解経路の解明を行い、BPA 分解に特化した AO1 株の作製を試みる予定である。

BisphenolA, transcriptome, resequencing

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A06a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A06 会場

クラミドモナス光化学系の定量プロテオミクス法の開発

Targeted proteome analysis of photosystem proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*

○大西 一輝[1]、徳丸 雄磨[1]、得津 隆太郎[2]、皆川 純[2]、豊島 正和[1]、松田 史夫[1]、清水 浩[1]([1]阪大院・情報、[2]基礎生物学研究所)
○Kazuki OHNISHI[1], Yuma TOKUMARU[1], Ryutaro TOKUTSU[2], Jun MINAGAWA[2], Masakazu TOYOSHIMA[1], Fumio MATSUDA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Grad. sch. IST, Osaka Univ, [2]National Institute For Basic Biology)

【目的】光化学系は、多数のサブユニットタンパク質の超複合体で構成されるが、各サブユニットの発現量を調節するメカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の光合成系タンパク質に注目し、各サブユニットの発現量を測定する定量プロテオミクス法の確立を試みた。定量プロテオミクスでは膜タンパク質の可溶化が必要となるため、複数の可溶化メソッドを検討した。
【方法】*C. reinhardtii* は、炭素源として酢酸を含んだ TAP 培地を使用し、23℃, 150 rpm, 50 μmol・ photons/m²/sec の条件で培養した。陰イオン性界面活性剤である SDC (Sodium Deoxycholate), SLS (Sodium Lauryl Sulfate) を用いた可溶化法は Masuda ら (J Proteome Res 2008) の方法を用いた。還元アルキル化・トリプシン消化は定法で実施した (Matsuda et al. JBB 2015)。定量プロテオームデータは nanoLC-MS/MS (LCMS-8060)を用いて取得し、データ処理は Skyline で行った。
【結果】TAP 培地で培養した *C. reinhardtii* の菌体から、膜タンパク質を可溶化、抽出する手法を検討した。細胞破砕法としてビーズ破砕と超音波処理、可溶化剤として KCl, SDC, SLS, CHAPS の組み合わせを比較した。従来の可溶化手法である KCl-ビーズ破砕法と比較して、SDC, SLS-超音波破砕法では、タンパク質の抽出効率が 4.7 倍に上昇することを見出した。光化学系タンパク質 169 種類を対象とした nanoLC-MS/MS 分析では、PSI サブユニットは全 18 タンパク質の内、前者の手法では 5 種類、後者では 9 種類を検出することに成功した。ATP シンターゼは全 15 タンパク質のうち、前者では 4 種、後者では 9 種のタンパク質が検出できた。光合成系全体では、KCl-ビーズ法が 39 種、SDC, SLS-超音波法では 50%に当たる 78 種が検出できた。

Chlamydomonas reinhardtii, proteome, photosynthesis

発表責任者：大西一輝（kazuki_ohnishi@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A06p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A06 会場

Proteome and acylome analyses of the modification landscape created by the functional interaction between plasmid pCAR1 and host *Pseudomonas putida* KT2440

○Delyana VASILEVA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Saori KOSONO[1,2], Minoru YOSHIDA[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science (RIKEN CSRS))

[Background] Understanding the interplay between a plasmid and the host system is important in order to predict the behaviour of plasmid-harbouring strains in the natural environments. Previous studies in our lab demonstrated that the carbazole-degradative plasmid pCAR1 alters the transcriptional networks and physiology of host *Pseudomonas putida* KT2440. Carriage of pCAR1 reduced fitness and swimming motility, and affected the primary metabolic capabilities of the cells, indicating modifications in the metabolic background of the host [1]. In this study, to better understand the integral response to pCAR1 carriage, we performed a comprehensive proteome analysis with log and stationary phase cells of the pCAR1-free and -harboring strains employing quantitative mass spectrometry approach based on stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). Furthermore, we evaluated the potential of two acyl lysine modifications (acetylation and succinylation) that respond to the metabolic status of the cell in the plasmid-host interactions.
[Results] The total proteomic analysis revealed that abundance of key proteins involved in central metabolism, signal transduction and motility was affected by pCAR1 carriage. A total of 1,359 unique acetylation sites on 637 proteins and 567 unique succinylation sites on 259 proteins were identified in two biologically-independent experiments. The acetylation and succinylation profiles differed between the log and stationary phases suggesting growth-stage-dependent dynamic regulation. Carriage of pCAR1 resulted in changes in the acylation status of proteins involved in carbohydrate metabolism, nucleotide metabolism and the ribosome. Furthermore, the host system invoked acylation of pCAR1-encoded proteins involved in carbazole degradation and plasmid maintenance, and on three nucleoid-associated proteins that play a pivotal role in the functional interaction with the chromosome. Bioinformatic analysis revealed more than 30 putative acetyltransferases and three putative deacetylases (PP_4764, PP_5340 and PP_5402) encoded on the chromosome of *P. putida* KT2440 and pCAR1. In a first set of experiments, to determine the factors affecting the protein acetylation status in the pCAR1-free and -harbouring strains, the three genes encoding putative deacetylases were inactivated by homologous recombination and comprehensive phenotypic analyses were conducted. Furthermore, detailed biochemical studies are being performed to determine how lysine acetylation and succinylation precisely affect the properties of the pCAR1-encoded proteins.
[1] Takahashi, Y. *et al*. (2015) *Environ Microbiol* **17:**134 –155.

plasmid, acylome, proteome

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A06 会場

経時的定量プロテオーム解析を用いた細胞内・分泌タンパク質一斉分析による *Clostridium cellulovorans* の植物構成多糖適応機構の解析

Analysis of adaptation mechanism by *Clostridium cellulovorans* to plant structural polysaccharides using temporal quantitative cellular and secreted proteome analyses

○油屋 駿介[1,2]、青木 航[1,3]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1,3] ([1]京大院・農・応用生命、[2]日本学術振興会（DC1）、[3]京都バイオ計測センター)
○Shunsuke ABURAYA[1,2], Wataru AOKI[1,3], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science, [3]Kyoto Integrated Science & Technology Bio Analysis Center)

【背景・目的】
Clostridium cellulovorans は、セルロソームと呼ばれる細胞外酵素複合体によって、効率よくセルロース・ヘミセルロース・ペクチンなどの植物由来の様々な構成多糖を分解できる。植物構成多糖の分解にあたって *C. cellulvorans* は、セルロソームを構成する糖質加水分解酵素と分泌型の糖質加水分解酵素の二つの組成を最適化している[1]。 加えて、本微生物は細胞外に存在する植物構成多糖の成分に応じて代謝系を大きく変動させている[2]。これらのプロセスは本微生物の生存戦略を表していると考えられるが、その詳細は未だ明らかになっていない。本研究では経時的プロテオーム解析を行い、*C. cellulovorans* の 4 つの植物構成多糖への適応過程を明らかにしようと試みた。本研究から得られる情報は、*C. cellulvorans* の代謝工学にも応用できると期待される。
【方法・結果】
4 つの植物構成多糖（セルロース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチン）とグルコースのそれぞれを唯一の炭素源として *C. cellulovorans* を培養した。生育曲線を作成し、それぞれの炭素源において 5 つのサンプリングポイントを決定した。それぞれのサンプリングポイントで分取した培養液を菌体画分と上清画分に分けて、それぞれからタンパク質を抽出・濃縮し、トリプシンでペプチド断片に消化することでプロテオームサンプルを調製した。得られたプロテオームサンプルを安定同位体でラベリングし、420 cm のモノリスカラムを用いた nano LC-MS/MS システムにより分析を行った。
今回、我々は、*C. cellulovorans* の遺伝子数の 40%程度のタンパク質を 1 ショット分析により同定した。これらのタンパク質プロファイルは炭素源とサンプリングポイントによって異なっておりそれぞれの生育環境を表していると考えられた。得られた結果を統計的に解析し、ネットワーク解析や経時的変化の解析を行った。その結果、*C. cellulovorans* の植物構成多糖への適応機構とそれにともなって発現を変動させているタンパク質のプロファイリングを行った[3]。
[1] K. Matsui et al, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 6576-6584 (2013)
[2] S. Aburaya et al, *AMB Express*, 5, 29 (2015)
[3] S. Aburaya et al, submitted

Clostridium cellulovorans, Proteomics, Adaptation mechanism

発表責任者：植田　充美（miueda@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A06p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A06 会場

微生物による有用物質生産の改善に資する代謝モデルの反応データベースおよび配列データからの自動構築

Automatic construction of metabolic model using genomic sequence and reaction database for improving valuable chemical productions by microorganisms

○厨 祐喜[1]、大山 彰[2]、荒木 通啓[1,3] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]インシリコバイオロジー、[3]京大院・医)
○Yuki KURIYA[1], Akira OHYAMA[2], Michihiro ARAKI[1,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]in silico biology, Inc., [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景・目的】様々な微生物による種々の有用物質の生産が広範に研究されている。また、次世代シーケンサーにより、種々の微生物の配列がハイスループットに取得され、集積されるようになってきた。そして、微生物による有用物質の生産のような大規模な代謝系を対象とする場合、化学量論モデルを用いたフラックスバランス解析(FBA)がよく用いられている。そこで本研究では、種々の有用物質生産の改善に資するかつ FBA によるシミュレーション・解析が可能な代謝モデルをゲノム配列や反応データベースから自動構築する手法の開発を目的とした。
【方法・結果】ケーススタディとして、公開済みゲノムスケールモデル(GSM)の性能が高く、実験データや知見が豊富な大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*)をホストに選択した。まず、ゲノム配列(例 GenBank ファイルなど)や反応データベース(例 KEGG など)を使用して *E. coli* でアノテーションされている代謝反応を集積し、ラフなモデルを構築した。次いで、得られたラフなモデルに細胞内外の代謝物輸送反応やバイオマス合成(菌体増殖)反応を追加した。ここでバイオマス合成反応は菌体構成成分の素となるアミノ酸や NTPs、dNTPs、貯蔵物質としてのグリコーゲン、NADH や NADPH などの補酵素からなっている。また、輸送反応は、炭素源(例グルコース)および酸素、窒素源や硫黄源などの無機塩類の取り込み、有機酸やアルコールなどの生成物や CO_2 の排出など最小培地での培養を想定し、追加した。そして、このモデルに対し、必要反応を追加し、FBA シミュレーションが可能なモデルへと修正した。得られたモデルの性能を評価するために、比較対象として、GSM iJO1366 とそれを基にコンパクト化したモデル EColiCore2(ECC2)を使用した。構築されたモデルの妥当性は ECC2 の特性評価に使用された 10 個のテスト項目(増殖に関する項目 5 つと代謝物の生産に関する項目 5 つから成る)によった。この 10 個のテスト項目について、構築されたモデルの FBA シミュレーション結果を iJO1366 と ECC2 の結果と比較したところ、構築されたモデルは最大比増殖速度が比較対象のモデルより高く出力されていた。そこで、不要反応の削除、反応式の修正などを施したところ、構築されたモデルによる最大比増殖速度の値の改善が見られた。以上より、本手法により、ゲノム配列や反応データベースから、より妥当な結果を出力する FBA が可能なモデルの構築が可能と考えられた。今後、*E. coli* の既存の実験データによる妥当性の検証とその他のホスト *Corynebacterium* や *Streptomyces* 属細菌などでのモデル構築の検証を実施する予定である。

genome sequence, reaction database, metabolic model

講演番号：3A06p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A06 会場

耐熱性メタゲノムライブラリーの構築と新規カタラーゼ開発への応用

Construction of metagenome library from hot spring soil and development of novel catalases using it

○富安 範行[1]、奥村 史朗[2]、山下 聡子[2]、仲山 真美[3]、冨岡 寛治[4]、松山 清[1] ([1]久留米高専、[2]福岡県工技セ、[3](有)SG ラボラトリー、[4]新居浜高専)
○Noriyuki TOMIYASU[1], Shiro OKUMURA[2], Satoko YAMASHITA[2], Mami NAKAYAMA[3], Kanji TOMIOKA[4], Kiyoshi MATSUYAMA[1] ([1]Kurume NCT, [2]Fukuoka ITC, [3]SG Laboratory, [4]Niihama NCT)

【背景・目的】

紙パルプの漂白や半導体洗浄など工業的に広く利用されている過酸化水素の排水処理は不可欠であり、近年環境負荷が少ないカタラーゼによる分解処理が普及してきた。しかし既存のカタラーゼ製品は耐熱性が低く、過酸化水素分解時の発熱により、活性が低下することが課題となっている。そこで本研究では、単離・培養法が確立されていない高温環境の微生物群のメタゲノムライブラリーを作成し、そこからカタラーゼ遺伝子を探索し、耐熱性に優れたカタラーゼの開発を目指した。得られたメタゲノムから作製したライブラリーに対して、カタラーゼ遺伝子保存領域を対象とした縮重プライマーを設計し、q-PCR によるスクリーニングを行い、増幅産物の塩基配列を決定した。また、その際に得られた増幅産物を In-Fusion クローニングにより既存のカタラーゼ遺伝子の相当部分と置換し、その一部が高温環境微生物由来であるキメラの組換えカタラーゼを作製した。

【方法・結果】

塚原地獄、雲仙地獄、栗野岳地獄において、49℃～90℃の環境の土壌を試料として、Zhou[1)]らの方法によりメタゲノム DNA を抽出した。得られたメタゲノム DNA を *Bam*HI、*Pst*I、*Eco*RI の 3 種類の制限酵素で断片化し、同じ制限酵素で処理した pSTV28 とライゲーションを行った後、*E.coli* DH5α 株で形質転換を行い、高温環境由来のメタゲノムライブラリーを作製した。このライブラリーについて、カタラーゼ遺伝子保存領域を対象とした縮重プライマーによる q-PCR を行い、増幅が確認できたクローンを得た。さらに、増幅産物の融解曲線解析を行い、宿主 DH5α 株由来カタラーゼ遺伝子含有クローンを除くことで、メタゲノム由来のカタラーゼ遺伝子のみを保有するポジティブクローン(PC)を選別した。このスクリーニングにより約 1,300 のクローンから、55 個の PC を選別し、その塩基配列を決定した。次に q-PCR から得られた増幅産物と、既知のカタラーゼ遺伝子（SG ラボラトリー所有株由来）を組み込んだプラスミドの相当部分とを In-Fusion クローニングにより置換した。この組換えプラスミドを *E.coli* BL21 株で形質転換し、カタラーゼ生産株を作製した。この生産株を 20℃で培養して、組換えカタラーゼを産生させた。現在これらの組み換えカタラーゼについて、酵素活性並びに耐熱性を調査中である。

1） Zhou J. et al., DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 62, 316-322 (1996).

Metagenome, thermostable enzyme, Catalase

講演番号：3A06p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A06 会場

コーヒーノキ根圏の微生物叢解析及びカフェイン代謝菌の探索

Analysis of the rhizosphere bacterial communities of coffea plants and the screening of caffeine metabolizing microbes

○川上 智、矢崎 一史、杉山 暁史（京大・生存研）
○Tomo KAWAKAMI, Kazufumi YAZAKI, Akifumi SUGIYAMA (RISH, Kyoto Univ.)

コーヒーは世界中で親しまれている嗜好飲料である。コーヒーノキはカフェインを蓄積し、カフェインはコーヒーノキにおいて、キサントシンから 3 種の N-methltransferase（XMT、MXMT、DXMT）によって生合成される。カフェインはコーヒーノキの葉や花や根や種子に含まれ、含量は種子が最も高い。カフェインはコーヒーノキ根から分泌されており、カフェインはコーヒーノキの発芽初期において根から顕著に分泌されることが明らかになった。カフェインは植物において虫害防御にも関与する。また、カフェインは *Tricoderma* 属菌の病原菌に対する拮抗作用を向上させることを見出しており、根圏微生物との相互作用における機能が示唆されている。コーヒーノキ根圏土壌では、滅菌土壌やダイズ土壌と比較してカフェインの分解速度が速いことから、コーヒーノキ根圏土壌ではカフェインを代謝する微生物の活性が高いことが示唆された。本研究では、カフェインのコーヒーノキ根圏微生物への影響を解析することを目的に、コーヒーノキ根圏微生物叢の解析と、根圏からのカフェイン代謝微生物の単離を試みた。

コーヒーノキ根圏微生物叢の解析として、コーヒーノキの実生の根圏、根から離れたバルク土壌、コーヒーノキを 10 年以上栽培している鉢の土から DNA を抽出し、MiSeq によるアンプリコンシーケンス解析を行った。各土壌における微生物叢を比較した結果、根圏から離れたバルク土壌と比較して、根圏土壌では植物の共生菌が多い *Proteobacteria* 門の存在比が最も高く、全体の約 50%を占めていた。その中では、根粒菌の一種である *Rhizobium* 属菌を含む *Alphaproteobacteria* 網が最も多かった。カフェイン代謝菌の探索のためにコーヒーノキ栽培土壌からカフェインを単一の炭素源として微生物を単離した。集積培養を行い、培養液を集積培地と同じ組成の寒天培地に塗布し、合計ｘｘ個のコロニーを単離した。得られた微生物の 16S rRNA 配列を解析し微生物を同定した。その結果、培養条件によって異なる微生物が単離された。カフェインを単一の炭素源とした条件では、アブラナ科の植物に対する生物農薬に用いられる *Variovorax paradoxus* が多数単離された。現在、それらを含む候補株の根圏における機能解析や形質転換体を用いた根圏微生物叢の解析を進めている。

coffee, rhizosphere, caffeine

講演番号：3A06p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A06 会場

機能メタゲノミクスで抗生剤投与が及ぼす乳児腸内細菌叢への影響を見る
Effect of antibiotics on gut microbiome of infant revealed by functional metagenomics
○高見 英人[1]、田中 彩[2]、下野 隆一[2]、豊田 敦[3]、荒井 渉[1]、今大路 治之[2]、多田 雄哉[1]、桑原 知巳[2] ([1]海洋機構資源、[2]香川大医、[3]遺伝研)
○Hideto Takami[1], Aya Tanaka[2], Ryuichi Shimono[2], Atsushi Toyoda[3], Wataru Arai[1], Haruyuki Imaohji[2], Yuya Tada[1], Tomomi Kuwahara[2] ([1]JAMSTEC, [2]Univ. Kagawa, [3]Nat. Inst. Genetics)

【背景および目的】
メタゲノミクス的解析の進展により、腸内細菌叢の乱れが様々な疾患と関連することが近年明らかになりつつある。特に、乳児の腸内細菌叢は不安定であるがゆえに、この時期の抗生剤投与が成長後の腸内細菌叢の形成に大きな影響を及ぼすと考えられている。我々は 1 組の一卵性双生児の腸内細菌叢を継続的に解析しており、その過程で抗生剤（Amoxicillin）投与を受けた 1 人の乳児において腸内細菌叢の破綻が 2 ヶ月にわたり持続する事例を経験した。本研究では、抗生剤の投与が及ぼす乳児の腸内細菌叢への影響を我々が独自に開発した生理代謝機能評価(MAPLE)システムを用いて調べたので報告する。
【方法と結果・考察】
保護者の同意を得た一卵性双生児から経時的 (生後 27 日、75 日、99 日、抗生剤投与終了 5 日後、19 日後、46 日後、66 日後) に便検体を回収した。各検体よりDNAを抽出した後、Illumina HiSeqを用いて各検体あたり配列長が 400bp 以上の 300 万配列データを取得した。これを MAPLE システムに供試し、各検体の菌叢と生理代謝ポテンシャルを比較した。MAPLE システムは、KEGG 機能モジュールの充足率やアバンダンスに基づきメタゲノム中の生理代謝機能の評価を可能としたシステムで、問題の多い従来の 16S rDNA 配列による菌叢組成解析ではなく、リボソームタンパク質遺伝子群に基づくより正確な菌叢組成解析も可能とする。その結果、抗生剤の投与を受けない乳児の腸内細菌叢は極めて安定で、16SrDNA による解析による従来の見解とは大きく異なっていた。抗生剤の投与により腸内細菌叢の大半を占める *Bifidobacterum* が壊滅し、菌数も 1/100 まで減少したが、菌叢回復に伴ってアバンダンスが上昇する代謝機能モジュールが複数同定された。これらの代謝機能は、抗生剤による撹乱から腸内細菌叢を回復させる原動力である可能性が示唆された。

metagenomics, human gut microbiome, MAPLE system

発表責任者：高見英人（takamih@jamstec.go.jp）

講演番号：3A06p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A06 会場

アスリートの腸内細菌叢多様性の解析
Analysis of the gut microbiota diversity of athletes
○鈴木 基生、鈴木 啓太 (AuB 株式会社)
○Motoo SUZUKI, Keita SUZUKI (AuB Ltd.)

【背景・目的】

腸内細菌叢の相違は、宿主に対して免疫機能や栄養吸収、メンタルなど様々な影響を及ぼすことが判明し、腸内細菌叢の役割が注目を集めるようになった。また、食事や運動などの生活習慣の変化が腸内細菌叢に作用することも最近は報告されている。本研究は腸内環境の改善をサポートすることによりアスリートの良好なコンディションの維持、パフォーマンスの向上に貢献することを目標としている。そこで、目標を実現するために必要な情報となるアスリートの腸内細菌叢の一般人との違いを明らかにすることを目的として本解析を行った。

【方法・結果】

日本人のアスリート 300 名、一般人 200 名の糞便を採取し、全細菌のゲノム DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子配列を増幅し、次世代シーケンサーによる配列解析から細菌組成データを得た。アスリートの腸内細菌叢についての研究として、アイルランド人を対象とした解析ではラグビー選手は一般人と比べて腸内細菌叢の多様性が高いという報告が既にあるため(1)、特に多様性に着目して解析した。その結果、腸内細菌叢の多様性は運動強度の高いトップアスリートでは運動習慣のない一般人よりも高くなる傾向があり、運動習慣と相関する可能性が示唆された。

【考察・意義】

本研究はアスリートを対象とした解析ではこれまで例のなかった大規模な調査を行ったことに意義がある。今後は競技の特性、選手の適性などを踏まえた詳細な解析が期待される。発表では多様性だけでなく、主成分分析によって得られたアスリートを特徴づける菌種組成についての結果も紹介したい。

1. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O'Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R, Kerins DM, Quigley E, Ross RP, O'Toole PW, Molloy MG, Falvey E, Shanahan F and Cotter PD. 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. Gut 63(12):1913-1920.

Athlete, micro-biome, gut microbiota

発表責任者：鈴木基生（motsuzu@aub.co.jp）

講演番号：3A07a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A07 会場

酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成制御

Regulation of *N*-acetyltransferase Mpr1-dependent novel arginine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

○神庭 拓也、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大.バイオ）
○Takuya Kamba, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi (naist)

【背景】当研究室で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1（sig**m**a 1278b gene for **p**roline analogue **r**esistance）は、プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸をアセチル化により解毒する酵素である。また、酵母において Mpr1 がアルギニン（Arg）合成を亢進し、新規の酸化ストレス耐性機構に関与することを明らかにした。一方、これまでの遺伝学的解析により、Mpr1 が Arg 合成経路の中間体である *N*-アセチルグルタミン酸（NAG）の生成に関与していることが示唆された。しかし、Mpr1 依存的な Arg 合成については未だ不明な点が多い。本研究では、Mpr1 依存的な新規 Arg 合成経路の分子機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】酵母においては、NAG を合成する酵素として、*N*-アセチルグルタミン酸合成酵素（NAGS）Arg2 およびオルニチンアセチルトランスフェラーゼ（OAT）活性と NAGS 活性を有する二機能性酵素 Arg7 が知られている。そこで、Mpr1 が Arg2，Arg7 の遺伝子破壊株の表現型に及ぼす影響を解析した。その結果、Mpr1 の過剰発現は、*Δarg2* 株の Arg 要求性を相補するが、*Δarg7* 株や*Δarg2/Δarg7* 株の Arg 要求性を相補しなかったことから、Mpr1 依存的な Arg 合成には Arg7 が関与していると考えられた。次に、*ARG7* の転写量をリアルタイム PCR により定量的に解析したところ、Mpr1 の過剰発現は、Arg 含有培地においては *ARG7* の転写量に影響を及ぼさなかったものの、Arg 非含有培地において *ARG7* の転写量を顕著に増加させた。また、*Δarg2* 株の Arg 要求性は Arg7 の過剰発現によって相補された。これらのことから、Mpr1 が *ARG7* の転写誘導を介して Arg 合成を亢進する可能性が示された。さらに、Mpr1 が Arg7 タンパク質量に及ぼす影響をウェスタンブロットにより解析するため、大腸菌を用いた組換えタンパク質として Arg7 の精製を行い、ウサギ抗 Arg7 ポリクローナル抗体を作製した。酵母細胞内で、Arg7 は翻訳後、オートプロセシングにより N 末端側、C 末端側に切断され、これらがミトコンドリア内で複合体を形成し、機能することが報告されている。そこで抗体作製には、N 末端側と C 末端側の混合物を抗原として用いた。現在、作製した抗 Arg7 抗体を用いたウェスタンブロットにより、Mpr1 が Arg7 タンパク質量に及ぼす影響を解析するとともに、細胞内 NAG 含量や粗酵素液中の NAGS 活性に及ぼす Mpr1 の影響を評価している。

N-acetyltransferase Mpr1, Arginine metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：3A07a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A07 会場

Fusarium graminearum におけるオートクレーブによる毒素産生抑制効果
Inhibitory effects of autoclaving compelx medium on trichothecene production by *Fusarium graminearum*
○田中 佑弥、中嶋 佑一、金丸 京子、小林 哲夫、木村 真（名大院生命農）
○ Yuya TANAKA, Yuichi NAKAJIMA, Kyoko KANAMARU, Tetsuo KOBAYASHI, Makoto KIMURA (Nagoya Univ.)

【目的】
Fusarium 属菌は穀物に感染し、トリコテセン系かび毒を生産して食の安全を脅かす。これまでの研究から、培地の組成や pH だけでなく、酵母エキス製品のロットの違いも毒素産生に大きな影響を及ぼすことが分かってきた。本研究ではさらに培地滅菌法の違いによる影響を調べるため、酵母エキスを含む天然培地をオートクレーブ滅菌とフィルター滅菌によって調整し、毒素産生量を比較した。
【結果・考察】
酵母エキスを窒素源、グルコース、フルクトース、スクロース、ガラクトース、キシロースのいずれかの糖を主たる炭素源として用いた天然培地を作製した。初期 pH などその他の条件は同じとし、*Fusarium graminearum* (JCM9873 株)を培養した際の毒素産生量を比較した。どの糖を用いた培地においてもオートクレーブ滅菌培地の方がフィルター滅菌培地よりも毒素産生量が減少したが、その減少量は糖によって著しい差があった。また、ガラクトース、キシロースではどちらの調整法によって作製した培地もほとんど毒素産生が見られなかったことから、トリコテセン生合成には適していない糖源であることも示唆された。スクロースを糖源とした場合、オートクレーブ滅菌することによる毒素産生量の減少は非常に小さかったのに対し、フルクトースを糖源とした場合はフィルター滅菌では毒素を産生していたにも拘らず全く毒素を作らなくなった。そこで還元糖とアミノ酸を一緒に熱処理することによって毒素産生を阻害する物質が生成されたのではないかと仮定し、分画を試みた。オートクレーブ滅菌培地を酢酸エチルによって抽出し、残りの水層を培地として用いて *F. graminearum* を培養したところ、毒素産生の回復が見られた。このことからオートクレーブによって毒素産生を阻害する物質が酢酸エチル層に抽出されたと考えた。現在、どのステップにおいて毒素産生が抑制されたのかを調べるためにトリコテセン生合成生合成遺伝子 *Tri5* や *Tri6* の発現解析を行っているところである。

Fusarium graminearum, trichothecene, autoclave

発表責任者：田中佑弥（tanaka.yuuya@a.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A07a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A07 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における NO による抗生物質生産制御機構
Nitric oxide regulates antibiotics production via two component system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)
○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 (東農大バイオ)
○Sota Honma, Shinsaku Ito, shunsuke Yajima, Yasuyuki Sasaki (Tokyo Univ. Agric.)

近年、我々の研究チームは放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 において、有機体窒素→硝酸→亜硝酸→NO→硝酸を循環する窒素代謝経路を見いだした。本経路により生産される NO が抗生物質生産及び形態分化を制御するシグナル分子であることが示唆された。しかし、NO による抗生物質の生産制御機構は多くが未だ不明である。そこで NO による抗生物質の生産制御機構の解明を目的とした。

これまでの結果より本菌には、*Mycobacterium* 属で知られるNO、CO、そしてO_2を感知するセンサータンパク質及びそのレスポンスレギュレーターから成るDosS/R二成分制御系と相同性を示すDevS/R二成分制御系が存在することを明らかとしている。そこでDevS/R二成分制御系と抗生物質生産の関連性を検証するために、*devS*破壊株、*devR*破壊株から抗生物質を抽出し定量した。結果、各破壊株における抗生物質の生産量は減少していた。さらに抗生物質の転写調節因子をコードする遺伝子(*actⅡ-ORF4*)の発現量をqPCRを用いて調べたところ、WTに比して*devR*破壊株では発現量が減少した。加えて各菌株をNOに短時間暴露した時、WTではNOが*actⅡ-ORF4*の発現量に顕著に影響を及ぼしたのに対し、*devR*破壊株では影響がほとんどなかった。以上の実験結果より、NOによる抗生物質生産の制御はDevS/R二成分制御系を介し調整されていることが示唆された。

Nitric oxide, Signaling, Streptomyces

講演番号：3A07a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A07 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株における低分子チオール化合物の意義
A role of small molecule thiols in *Streptomyces coelicolor* A3(2)
○澁井 佑生子、佐藤 眸、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大バイオ）
○Yukiko SHIBUI, Hitomi SATO, Shinsaku ITO, Syunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. Agric.)

放線菌は主に土壌中に生息するグラム陽性菌であり、複雑な形態分化や多種多様な抗生物質などの二次代謝産物を生産することから有用な微生物であることが知られている。
我々の研究では、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株が、有機体窒素から硝酸を生産し、硝酸還元酵素と Flavohemoglobin (NO dioxygenase)を介して亜硝酸、NO と順次生産し、再び硝酸に戻す窒素酸化物循環サイクルを見出した。本経路によって生産される NO は、胞子形成や抗生物質生産のシグナルとして働く。

エルゴチオネイン (ERG)とミコチオール (MSH)は、放線菌が恒常的に生産する低分子チオール化合物であり、抗酸化作用をもつことが報告されている。また、*Mycobacterium* 属細菌では MSH 変異体が酸化ストレスに対して高い感受性を示し、MSH を細胞内のレドックス緩衝系として利用していることが明らかになっている。一方、一般的にチオール化合物は NO により容易にニトロソ化される。そこで、本研究は本菌内で生産される NO と ERG 及び MSH の関係性の有無を明らかにすることを目的とし、ERG 及び MSH のそれぞれの生合成に関与する *egtA*, *mshC* 遺伝子をそれぞれ破壊した株を作成し、野生株との比較を行った。形態観察、抗生物質の定量実験、さらに、NO 依存的に発現する *hmpA* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により検証した結果、低分子チオール化合物と NO との関係性が示唆された。

Nitric oxide, homeostasis, Streptomyces

講演番号：3A07a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A07 会場

光量変化に対するシアノバクテリア代謝応答の解析
Short term metabolic adaptation of cyanobacteria during light/dark transitions
○丸山 正晴、西口 大貴、豊島 正和、松田 史生、清水 浩（阪大院・情報）
○Masaharu MARUYAMA, Hiroki NISHIGUCHI, Masakazu TOYOSHIMA, Fumio MATSUDA, Hiroshi SHIMIZU (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

[背景]光合成細菌のシアノバクテリアでは、昼夜サイクル等の光量変化に応じで、明反応からの ATP と NADPH の供給が増減すると考えられている。ATP と NADPH を消費する炭素固定回路では、レドックス制御の存在が知られているが、ATP と NADPH の供給過剰、不足に対するバッファー機構の詳細は不明である。そこで本研究ではシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の中心代謝経路および炭素固定経路の中間代謝物含量を測定し、明暗条件を切り替えたときの中間代謝物含量の経時変化を解析した。
[方法] *Synechocystis* sp. PCC 6803 の野生株を 100 ml の BG11 培地でフラスコ培養した。培養は 34℃, 150 rpm で行った。光の照射のオン（明条件：40 μE/m^2 sec）とオフ（暗条件）を 12 時間ごとに切り替えながら培養し、菌体をフィルター法で回収した後クエンチを行った。代謝物抽出はメタノール・クロロホルム・水抽出法で行った。GC-MS 用の誘導体化として、オキシム化とトリメチルシリル化を行った。代謝物は LC-MS/MS（AB SCIEX：API 3200 LC-MS/MS System）および GC-MS（Shimadzu：GCMS-QP2010 Ultra）で定量した。
[結果] *Synechocystis* sp. PCC 6803 を明暗条件を切り替えながら、228 時間（明条件 12 h：10 回、暗条件 12 h：9 回）培養した後、明条件から暗条件へと移行した。0, 5, 7, 10, 15, 20, 30 分後の菌体を回収して代謝物の分析を行い、中間代謝物 23 種類と補酵素 5 種類の代謝物プロファイルを得た。炭素固定反応 (RuBisCo) の基質である RuBP 含量は、3 分後に 0 分後に比べ 2.1 倍に増加し、生成物の 3PG は 0.72 倍に減少していた。この結果から、暗条件の移行後 3 分以内に RuBisCO の不活性化が起きていると推測された。またペントースリン酸経路では、NADPH 再生反応の生成物である 6PG が、3 分後には 2.5 倍に増加した。また、グリコーゲン代謝中間体の G1P は 4 分後には 0 分後に比べ 1.8 倍に増加していた。これらの結果から明条件から暗条件へ移行したシアノバクテリアでは、炭素固定反応、NADPH 合成反応、グリコーゲン代謝の活性が分オーダー変化していることが示唆された。

Cyanobacteria, Light / Dark condition, Metabolic adaptation

発表責任者：丸山正晴（masaharu_maruyama@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A07a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A07 会場

Clostridium paraputrificum の水素ガス生産に関わる代謝経路の分子遺伝学的解析
Genetic analysis of metabolic pathway for hydrogen production by *Clostridium paraputrificum*
関 兵馬、國武 絵美、粟冠 真紀子、○木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
Hyouma Seki, Emi Kunitake, Makiko Sakka, ○Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ.)

我々は微生物による水素ガス生産を究極の目的として、三重大学キャンパス土壌から単離した水素高生産性の嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 の代謝経路の解析を行っている。嫌気性細菌は解糖系によるピルビン酸生産までの経路は好気性菌と同じであるが、ピルビン酸からアセチル CoA への変換と、ATP 生産や解糖系で生じた余剰の還元力を酸化するために酢酸や酪酸、アルコール、水素ガスを生産する嫌気性細菌特有の代謝経路を持つ。しかし、菌により中心的に働く経路にも差があり、全容が解明されているとは言いがたい。本研究では、*C. paraputrificum* M21 による水素ガス生産の経路を解明するため、ゲノム情報から推測される上記代謝系遺伝子の破壊による解析を行っている。すでに乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株(*Δldh*)、アセチル CoA から酪酸やブタノールを生産する中心経路となるチオラーゼ遺伝子破壊株(*Δthl*)、アセチル CoA から酢酸生産に働くリン酸トランスアセチラーゼ遺伝子破壊株(*Δpta*)を作出して報告している。*Δldh* 株は乳酸を生産せず、水素ガスが増加した。*Δthl* 株は酪酸を生産せず、他の有機酸が増加し、水素は減少した。*Δpta* 株は酢酸の生産が低下し、乳酸の生産が増加したが、酪酸と水素が減少した。本報告では、ブチリル CoA から酪酸生産に働くリン酸トランスブチラーゼ遺伝子破壊株(*Δptb*)及び、ブタノール生産経路に関わるブタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株(*Δbdh*)、ピルビン酸からアセチル CoA を生じる経路に働くピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ遺伝子破壊株(*Δpfo*)を作出し解析した。

遺伝子破壊には Nottingham 大学が開発した ClosTron 法を用いた。各遺伝子破壊株を、グルコースを炭素源として嫌気瓶で培養し、発酵ガスと培地中の有機酸やアルコールをガスクロマトグラフィーや HPLC で定量した。*Δptb* 株は酪酸の生産が完全に消失し、乳酸・酢酸・エタノール・ブタノールの生産が増加し、水素の生産は減少した。これらは酢酸生産による ATP 合成を増加させ、ブチリル CoA 生産過程における NADH 消費を他の経路で消費しようとした結果と予測された。*Δbdh* 株はブタノール生産が消失せず、酢酸・エタノールの生産が増加し水素の生産が減少した。一方、*Δpfo* 株は水素と二酸化炭素の生産が完全に消失し、乳酸・ギ酸の生産が増加した。また、酢酸・酪酸・エタノールの生産が大幅に減少した。以上の結果は、本菌の水素ガス生産がピルビン酸からアセチル CoA への反応で生じるフェレドキシンの酸化還元を介した経路に依存している事を示唆している。

Clostridium paraputrificum, hydrogen gas, genetic analysis

発表責任者：木村哲哉（t-kimura@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A07a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A07 会場

Multidrug transporter が *Debaryomyces hansenii* の高濃度フェノール分解能に及ぼす影響について
Effect of the multidrug transporter on degradation of high concentration phenol by *Debaryomyces hansenii*

○栗原 甘奈、浜本 牧子 (明治大院・農)
○Kanna Kurihara, Makiko Hamamoto (Meiji Univ. Grad. Sch)

【目的】
環境浄化への応用を目標にフェノール分解性海洋酵母の探索を行った結果、ベンゼン環の *ortho*-開裂により高濃度フェノール資化性深海酵母 *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*)を見出した。本研究では深海酵母が *D. hansenii* 基準株に比べて著しく優れたフェノール分解能を有する要因について、フェノールの取り込み効率の観点から検討を行った。
【方法】
D. hansenii 基準株のゲノム配列からフェノール輸送に関わる可能性のあるトランスポーター遺伝子を推定し、フェノール単一炭素源培地で培養を行った際の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定し、培地中の残存フェノール量との関係を経時的に調べた。
【結果】
Saccharomyces cerevisiae の multidrug transporter FLR1 に類似の MDT2 について調べた。その結果、MDT2 の発現量は、培養開始直後からフェノール分解開始直後までの間、著しく高く、その後、培地中の残存フェノール量の減少に伴い発現量も低下することが明らかになった。このことから、MDT2 は *D. hansenii* 基準株のフェノール輸送関連トランスポーター遺伝子であることが示唆された。深海酵母の MDT2 発現量と培地中の残存フェノール量の変化との関係、及び、深海酵母と基準株の MDT2 の発現の比較についても報告する。
(本研究は海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センターとの共同研究に基づくものである)

Debaryomyces hansenii, phenol, multidrug transporter

講演番号：3A07a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A07 会場

コエンザイム Q_{10} の生合成に関わる新しい遺伝子の発見と機能解析

Identification and the functional analysis of novel coenzyme Q_{10} biosynthetic gene

○西田 郁久、大森 夕貴、柳井 良太、松尾 安浩、戒能 智宏、川向 誠（島根大・生物資源）
○Ikuhisa NISHIDA, Yuki OMORI, Ryota YANAI, Yasuhiro MATSUO, Tomohiro KAINO, Makoto KAWAMUKAI (Fac. of Life and Environ. Sci. Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ）は、真核生物のミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。CoQ は、キノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、ヒトや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではその側鎖長が 10 である CoQ_{10} を生合成する。*S. pombe* では *dps1*, *dlp1*, *ppt1*, *coq3*～*coq9* の少なくとも 10 種の遺伝子が CoQ_{10} の生合成に関与する。それらの遺伝子破壊株は CoQ_{10} の生合成が欠損あるいは著しく低下しており、呼吸欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上での生育遅延などの表現型を示すことが知られている [1) 2)] 。一方、真核生物における CoQ のキノン骨格前駆体の生合成経路に関してはほとんど未解明であり、本研究ではその同定を試みた。

まず *S. pombe* のミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子（400 個）の破壊株における CoQ_{10} 含量を網羅的に定量した。その結果、明確に CoQ_{10} 含量が低下する遺伝子破壊株が得られ、CoQ 生合成に関与する新しい遺伝子を複数見出した。その中で CoQ 生合成に関与する機能未知な新しい遺伝子を *coq12* と命名した。次に、CoQ のキノン骨格部分の形成に関わる *p*-hydroxybezoate やその推定前駆体の添加時における影響を評価した。*coq12* 破壊株を *p*-hydroxybenzyl alcohol、*p*-hydroxybenzaldehyde、*p*-hydroxybezoate などの化合物を単独で添加した培地において生育させたところ、*p*-hydroxybenzaldehyde や *p*-hydroxybezoate の添加時に CoQ_{10} の生産性や最少培地での生育遅延が回復した。一方、*p*-hydroxybenzyl alcohol の添加では *coq12* 破壊株の表現型は変化しなかった。さらに、細胞内の局在解析を行うために Coq12 の C 末端に GFP を付加したタンパク質を *S. pombe* で発現させたところ、ミトコンドリアにおける蛍光が観察された。これらのことから、Coq12 がミトコンドリアにおいて *p*-hydroxybenzyl alcohol などのキノン骨格前駆体の代謝経路に関与する新規因子であると考えている。

また、C 末端に His タグを付加した Coq12 を *S. pombe* から精製し、NAD^+を補酵素として野生株や *coq12* 破壊株由来のエタノール抽出物と反応させたところ、*coq12* 破壊株由来の抽出物との反応時に顕著な NADH の生成がみられた。このことから、*coq12* 破壊株には Coq12 の基質となる化合物が蓄積していると考えられた。現在、Coq12 の基質の特定を試みている。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行った。

1) Kawamukai M. *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **80**: 23-33 (2016)
2) Hayashi K. *et al*. *PLOS ONE* **9**(6): e99038 (2014)

Coenzyme Q_{10}, Fission yeast, Mitochondria

発表責任者：西田郁久（i-nishida@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3A07a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A07 会場

微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝調節機構の解明
Identification of molecular mechanism for anaerobic wax ester metabolism in *Euglena gracilis*
木村 光宏[1,2]、石井 侑樹[1,2]、小川 貴央[1,2]、丸田 隆典[1,2]、森 大[3,4]、○石川 孝博[1,2] ([1]島根大生資科、[2]JST/CREST、[3]慶應大先端生命研、[4]慶應大政策・メディア)
MITSUHIRO KIMURA[1,2], YUUKI ISHII[1,2], TAKAHISA OGAWA[1,2], TAKANORI MARUTA[1,2], MASARU MORI[3,4], ○ Takahiro ISHIKAWA[1,2] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]JST/CREST, [3]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [4]SFC Grad. Sch. Media Govern., Keio Univ.)

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、好気条件下において貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）を合成・蓄積し、嫌気条件下ではパラミロンからミリスチルミリスチン酸(C28)を主成分とするワックスエステルへと代謝変換する。我々は嫌気条件に応答したユーグレナのワックスエステル代謝調節機構の解明を目指しており、これまでにその制御は転写や翻訳レベルではなく、翻訳後修飾がかぎ重要である知見を得ている。本研究ではリン酸化修飾に着目し、リン酸化によるワックスエステル代謝調節の可能性を検証するとともに、関連するタンパク質因子の同定を試みた。

定常期の SM-ZK 株に対しプロテインキナーゼ阻害剤 K252a 処理した結果、嫌気後のワックスエステル蓄積量が著しく抑制され、リン酸化修飾の関与が強く示唆された。リン酸化プロテオーム解析の結果、好気/嫌気条件の変化に対して有意にリン酸化レベルが変動した約 2,000 ペプチドの中から、26 個のプロテインキナーゼを同定した。合成二本鎖 RNA 導入により、各プロテインキナーゼのサイレンシング細胞を作出し、嫌気 24 時間処理後の C28 量を測定した。その結果、ひとつのプロテインキナーゼ発現抑制細胞において、コントロール細胞に較べ C28 の蓄積が顕著に抑制されることが認められ、このプロテインキナーゼを WSRK (Wax ester Synthesis Regulatory Kinase)と命名した。WSRK サイレンシング細胞では、好気培養時のパラミロン蓄積レベルおよび嫌気処理後のパラミロン分解能に影響は認められなかった。一方、全脂肪酸を測定した結果、WSRK 細胞ではミリスチン酸をはじめとする各種脂肪酸量が抑制されていた。以上の結果より、嫌気時の WSRK によるワックスエステル代謝制御は、脂肪酸合成系のダウンレギュレーションに起因することが強く示唆された。

Euglena gracilis, Wax ester, Proteome

発表責任者：石川孝博（ishikawa@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3A07a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A07 会場

比較プロテオーム解析による微細藻類ユーグレナのパラミロン代謝酵素の探索
Comparative proteome analysis reveals anaerobic paramylon metabolic enzymes in *Euglena gracilis*

○後藤 京[1,2]、田中 優史[1,2]、西野 耕平[1,2]、小川 貴央[1,2]、丸田 隆典[1,2]、石川 孝博[1,2]（[1]島根大学・生資科・生命工、[2]JST/CREST）
○Kyo Goto[1,2], Yuji Tanaka[1,2], Kohei Nishino[1,2], Takahisa Ogawa[1,2], Takanori Maruta[1,2], Takahiro Ishikawa[1,2] ([1]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]JST/CREST)

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、好気培養条件下においてβ-1,3-グルカンで構成された貯蔵多糖パラミロンを合成・蓄積する。嫌気条件下ではパラミロンを分解し、得られたグルコースから解糖系、脂肪酸合成系を経て最終的にワックスエステルを合成する。この過程は解糖系における基質レベルの ATP を獲得することから、ワックスエステル発酵と呼ばれ、ユーグレナ独自の代謝経路である。パラミロンは高い結晶構造率を持つ顆粒を形成しており、*in vitro* ではアルカリ処理等で構造を緩和しないかぎり容易に分解することはできない。しかし嫌気条件に応答したユーグレナの細胞内では、容易にパラミロンを分解するが、その代謝酵素を含め分解機構は不明である。そこで本研究では、ユーグレナ細胞から調整したパラミロンに対する比較プロテオーム解析を行うことで、パラミロン代謝関連酵素の同定を目的としている。

好気条件下で定常期まで培養したユーグレナおよびその後嫌気 6 時間処理した細胞から、それぞれパラミロンを抽出し、界面活性剤を用いてパラミロン会合タンパク質を調製した。得られたタンパク質画分はプロテアーゼ処理後、モノリシスカラムを用いた nanoLC/MS により分析し、Progenesis QI により比較解析した。その結果、総計 395 タンパク質が同定され、このうち好気条件と嫌気条件で有意に検出レベルが増加したタンパク質は、それぞれ 104 個および 135 個であった。嫌気特異的に応答するタンパク質の中には、嫌気特異的に応答するエンド型-β-1,3-グルカナーゼおよびホスホリラーゼ様タンパク質などパラミロン分解への関与が示唆される酵素を含む 25 個の糖代謝関連酵素が見いだされた。これらの酵素遺伝子について、二本鎖 RNA の導入による遺伝子発現抑制を行い、パラミロン代謝に及ぼす影響を検証したところ、2 つのエンド型-β-1,3-グルカナーゼおよび 3 つのホスホリラーゼ様タンパク質の遺伝子抑制株において、嫌気応答後のパラミロン分解が有意に抑制されることが示された。

Euglena gracilis, Paramylon, Proteome

講演番号：3A07a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A07 会場

スーパーC_1酵母の育種に向けた高メタノール環境適応の分子メカニズムの解明
Analysis of molecular mechanism for adaptation to high methanol condition in C_1 yeast
川瀬 貴斗、藤田 千佳子、稲垣 瑞穂、島田 昌也、早川 享志、○中川 智行（岐阜大応生）
Takato KAWASE, Chikako FUJITA, Mizuho INAGAKI, Masaya SHIMADA, Takashi HAYAKAWA, ○Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【目的】
メタノールは、植物バイオマスや温暖化ガス CO_2 や CH_4 から直接合成でき、水と CO_2 にまで完全燃焼されることから、現在、最も環境負荷の少ない次世代型エネルギー源のひとつとされている。私たちは、メタノールを資化できる C_1 酵母を利用し、メタノールを出発原料としたカーボンニュートラルな「メタノール-バイオリファイナリー技術」を構築することで低環境負荷型社会実現に貢献できると考えている。しかし、C_1 酵母は 5%を超える高メタノール環境下で強い生育阻害を示すことから、C_1 酵母の細胞機能を産業分野に応用するには、そのメタノール生育能の強化が必要不可欠である。
これら背景から、本研究では C_1 酵母の高メタノール環境適応の分子機構を示し、それを基に高メタノール条件下においても十分な生育・発酵能を発揮するスーパーC_1酵母株の育種を目的とした。
【結果および考察】
Pichia pastoris を用いて、EMS 処理にて 7%メタノール条件下で野生株よりも良好な生育を示す高メタノール耐性株として TK3 株を選抜した。そこで、高メタノール環境適応に重要な遺伝子群を同定するため、野生株と TK3 株を用いたトランスクリプトーム解析を行った。まず、0.5%および 5%メタノール環境の発現プロファイルを比較したところ、野生株では高メタノール環境下において 82 遺伝子の発現が 10 倍以上に上昇し、126 遺伝子で 1/10 に減少した。特に高メタノール環境下では脂肪酸代謝系の発現が大きく変動し、C_1 酵母は β-酸化系の遺伝子群の発現を上昇させ、一方で合成系の遺伝子群の発現を低下させていた。一方、5%メタノール環境下における発現プロファイルを野生株と TK3 株で比較したところ、その発現パターンはほとんど変化しておらず、10 倍以上に発現量が変化したのはイノシトール合成系のイノシトール 1-リン酸シンターゼをコードする *INO1* のみであった。そこでイノシトール関連遺伝子群の高メタノール環境に対する発現応答を解析したところ、イノシトール輸送体をコードする *ITR1* と *ITR2* の発現がそれぞれ 10.7 倍と 7.76 倍に上昇していた。さらに、メタノール生育環境下にイノシトールを添加したところ、野生株は TK3 株と同様に高メタノール環境下でも良好な生育を示した。*P. pastoris* がイノシトールを資化できないことから、C_1 酵母は高メタノール環境でイノシトールを細胞内に蓄積する方向に代謝を制御しており、イノシトールが C_1 酵母の高メタノール環境適応機構において重要な鍵因子であることが推測された。これらのことから細胞内イノシトール供給を正に制御することでスーパーC_1酵母株の育種が達成できることが示された。

methanol, *Pichia pastoris*, transcriptome

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A07a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A07 会場

Acidomonas 属酢酸菌のランタノイド依存性メタノール酸化系の役割
Role of lanthanides-dependent methanol oxidation in methylotrophic acetic acid bacterium, *Acidomonas methanolica*

○宇都宮 大貴[1]、三井 亮司[2]、阿野 嘉孝[1] ([1]愛媛大院農・生命機能、[2]岡山理大理)
○Daiki UTSUNOMIYA[1], Ryoji MITSUI[2], Yoshitaka ANO[1] ([1]Ehime Univ., [2]Okayama Univ. of Sci.)

【背景】*Acidomonas methanolica* は、メタノール資化能をもった酢酸菌であり、ピロロキノリンキノン（PQQ）依存性のメタノール脱水素酵素（MDH）やアルコール脱水素酵素（ADH）などがペリプラズム空間で基質を酸化して、エネルギー代謝の初発酸化反応として機能している。これまでに、*Methylobacterium extorquens* など多くのメチロトローフ細菌において、MDH として、PQQ の結合に Ca^{2+}を補因子とする MxaF と、ランタノイドである La^{3+}を補因子とする XoxF の存在が確認され、La^{3+}存在下では MxaF の発現を抑制し XoxF が機能することが明らかにされている [(1-2)]。本菌では、同様に MDH として MxaF と XoxF が存在し、La^{3+}によって制御されているが、他のメチロトローフ細菌とは異なり、XoxF 発現時は、MxaF 発現時に比べ MDH 活性の *Km* 値が非常に高い値を示すことが明らかとなっており[(3)]、MxaF 発現時と XoxF 発現時ではメタノール代謝に異なる役割があることが示唆されている。本研究では、*Ac. methanolica* の La^{3+}存在下におけるメタノール酸化系の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】*xoxF* 遺伝子破壊株を、メタノールで培養すると La^{3+}添加条件（La+）において生育を示さなくなり、XoxF は La+でのメタノール生育に必須であった。ゲノム上の *xoxF* の周辺には、電子受容体となるシトクロム c 遺伝子のほか、*xoxF* 下流に転写因子と推測される遺伝子（*frmR*）が存在しており、RT-PCR により、*frmR* は、*xoxF* とオペロンを形成しており、La+で、XoxF とともに発現していた。これらのことから、この転写因子が *xoxF* の発現に関与していると推測されたが、興味深いことに、*frmR* 破壊株においても La+で XoxF が発現しており、野生株に比べ良い生育を示した。その原因を調査すると、*frmR* 破壊株では野生株でみられる培地中のホルムアルデヒド蓄積が解消されていた。これらの結果から、La+では、XoxF でメタノールを酸化し FrmR が細胞内でのホルムアルデヒドの資化を抑制していることが示唆され、La^{3+}依存性メタノール酸化系を駆動させることでホルムアルデヒドを細胞外に蓄積し、自然界での生存競争を優位にしていると推測された。

（1）Nakagawa et al., (2012) *PloS one*, *7*(11), e50480.
（2）Vu, Huong N et al., (2016) *Journal of bacteriology* 198.8: 1250-1259.
（3）宇都宮ら(2017)日本農芸化学会 2017 年度大会 2C24a08

Methylotrophs, Lanthanides, Methanol dehydrogenase

発表責任者：阿野嘉孝（anoy@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：3A07a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A07 会場

グリセロール環境下における *Moniliella megachiliensis* SN-124A のストレス応答
Stress response under the glycerol medium in *Moniliella megachiliensis* SN-124A

○岩田 悠志[1]、松井 美咲子[1]、伏屋 瑞季[2]、安彦 良祐[2]、春見 隆文[1]、渡邉 泰祐[1,2]、荻原 淳[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資研究科・生資利用)
○Hisashi IWATA[1], Misako MATSUI[1], Mizuki FUSHIYA[2], Ryosuke ABIKO[2], Takafumi KASUMI[1], Taisuke WATANABE[1,2], Jun OGIHARA[1,2] ([1]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ, [2]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ)

[背景] 担子菌系酵母 *Moniliella megachiliensis* は、高糖濃度条件下で適合溶質として著量のエリスリトールを生成する。エリスリトールは、低カロリー性や保湿性などの機能特性から食品や化粧品等に広く利用されているが、近年では、それらに加えてバイオ樹脂など化成品の原料としての用途も期待されている。我々は、化成品の原料として廃グリセロールからのエリスリトール発酵生産技術の確立を目指している。これまでに、炭素源グリセロールにおける培養条件の最適化 (安彦ら、日本農芸化学平成 29 年度大会) 及びトランスクリプトームによる代謝経路 (荻原ら、日本応用糖質科学平成 29 年度大会) について明らかにしつつある。そこで本研究では、炭素源をグリセロールとグルコースとした際のポリオール生成量の経時変化と *transketolase* (*tkl*) 及び *erythrose reductase* (*er*) 遺伝子等の発現挙動の比較解析を行うことにより、本菌のグリセロール条件下におけるストレス応答機構を明らかにすることを目的とした。

[方法] 対数増殖期の *M. megachiliensis* SN-124A を 20%グルコースもしくはグリセロールによる浸透圧ストレスを負荷し、0, 1, 4, 8 時間培養した。培養した細胞は、total RNA 抽出及びポリオール抽出を行い、real-time PCR による遺伝子発現の解析と HPLC による各種ポリオールの分析を行った。

[結果] グルコース条件下において、本菌は、ストレス負荷時間の経過 (8 時間まで) に伴い、適合溶質であるグリセロール (177.2 μmol/g dry cells) やエリスリトール (349.7 μmol/g dry cells) を増加するとともにトレハロース (442.6 μmol/g dry cells) も同時に増大した。一方、グリセロール条件下では、グルコース条件下に対するグリセロール蓄積量が 3.7 倍、エリスリトール蓄積量が 1/3 倍であった。また、細胞内トレハロース量は、ストレス負荷直後から減少した。

グルコース条件下における *tkl* isogenes (*tkl1*、*tkl2*) 及び *er* isogenes (*er1,2*、*er3*) の遺伝子発現の動態は、プロモーター領域にストレス応答配列 (STRE; stress response element) を有する *tkl1* や *er3* がエリスリトール生成との相関性を示した。一方、グリセロール条件下においては、*tkl1* がグルコース条件下と同様にエリスリトール生成に伴う発現量の上昇がみられた。また、*er1,2* 及び *er3* は浸透圧ストレスに応答するものの、エリスリトール生成との相関性はみられなかった。

以上の結果から、グリセロール条件下のストレス初期段階において、本菌はエリスリトール生成量を調節しながら、トレハロースを分解・代謝することにより、ストレス適応を図っていることが示唆された。本研究は、戦略的創造研究推進事業 ALCA の助成を受けて行った。

osmotic stress, eryhtritol, glycerol medium

発表責任者：岩田悠志（iwata.hisashi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A07a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A07 会場

Candida versatilis SN-18 におけるマンニトールデヒドロゲナーゼの機能解析
Function of mannitol dehydrogenase in *Candida versatilis* SN-18

○伏屋 瑞季[1]、岩田 悠志[2]、春見 隆文[2]、渡邉 泰祐[1,2]、荻原 淳[1,2] ([1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化)
○ Mizuki FUSHIYA[1], Hisashi IWATA[2], Takafumi KASUMI[2], Taisuke WATANABE[1,2], Jun OGIHARA[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ.)

浸透圧耐性酵母である *Candida versatilis* SN-18 は高糖濃度 (20%グルコース) 条件下で著量のグリセロールを生産する。我々は *C. versatilis* SN-18 の発酵によるグリセロール生産に着目し、研究を行った。ところが、本菌は培養時間の経過とともにグリセロールと同等かそれ以上のマンニトール生産性を示したことから、新たに本菌のマンニトール生産に着目した。マンニトール生成経路は、*Aspergillus niger* において研究され、解糖系の中間代謝産物であるフルクトース-6-リン酸 (F-6-P) を出発物質として Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MPD) によるマンニトール-1-リン酸への還元後、脱リン酸化によって生成される経路と、F-6-P の脱リン酸化によって生成されたフルクトースが Mannitol dehydrogenase (MDH) による還元によって生成する 2 つの経路が報告されている。これまでの検討結果から、本菌において MPD 活性は確認できていないが、MDH 活性は確認している。また、2016 年に公開された *C. versatilis* のドラフトゲノム情報を用いて、MPD、MDH 遺伝子の探索を行ったところ、既知の MPD 配列と相同性の高い遺伝子は見つからなかった。一方、MDH 遺伝子については *Aspergillus* 属等の真菌類の MDH と相同性の高い遺伝子が見出された。取得した配列情報を基に *C. versatilis* SN-18 の MDH 遺伝子 (*Cvmdh*) の完全長を決定し、Blast 検索の結果、真菌類よりも細菌類の MDH に相同性が高いことを明らかにした (伏屋ら、日本農芸化学会 2017 年度大会) 。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は MDH 遺伝子を有しているが、酵素活性レベルでは発現していないことが報告されている。そこで本研究では *C. versatilis* における MDH 遺伝子をクローニングし、構築したプラスミドを *S. cerevisiae* に導入して酵素活性の有無を調べた。その結果、導入株は、親株では確認されなかった MDH 活性が確認されたことから *Cvmdh* がコードするタンパク質は MDH であることが明らかとなった。さらに、本菌におけるマンニトール生成と MDH の関係性を明らかにするため、マンニトール生産条件における経時的なポリオール測定、MDH 活性測定、*Cvmdh* 発現量解析を行った。その結果、細胞内マンニトールが最大値を示した 3 日目に MDH 活性も最も高くなり、4 日目以降はマンニトール蓄積量の減少に伴って MDH 活性も低下した。また、*Cvmdh* 発現レベルについては 3 日目まで上昇し、その後低下する傾向が見られた。即ち、*Cvmdh* 発現量、MDH 活性、細胞内マンニトール蓄積の増減には相関性があった。これらのことから *C. versatilis* SN-18 におけるマンニトール生成には明らかに MDH が関与していることが示唆された。

mannitol dehydrogenase, mannitol, Candida versatilis

講演番号：3A07p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A07 会場

Rhizopus delemar の育種によるフマル酸生産性の向上

Improvement of fumaric acid productivity by strain development of *Rhizopus delemar*.

○大石 奈穂美[1]、郡 彩子[1]、村上 紀里子[1]、西村 祐美[2]、髙橋 史員[2]([1]株式会社ちとせ研究所、[2]花王・生科研)

○ Naomi OHISHI[1], Ayako KORI[1], Kiriko MURAKAMI[1], Yumi NISHIMURA[2], Fumikazu TAKAHASHI[2] ([1]Chitose Laboratory Corp., [2]Biol. Sci. Res., Kao Corp.)

【背景・目的】

フマル酸は、食品添加物（酸味料）、合成樹脂や生分解性ポリマーなどの原料であり、幅広い分野で利用されている有機酸である。現在は、主に石油原料を用いた化学合成でフマル酸が生産されているが、より持続的な製造が可能である *Rhizopus* 属を用いた発酵生産の関心が高まっている。われわれは *Rhizopus delemar* 02T6 株のフマル酸高生産を目指し、育種改良をおこなった。

【方法】

02T6 株の変異処理には、化学変異原である変異カクテルを用いた。変異カクテルは、不均衡進化理論 [1)]に基づきちとせ研究所によって開発され、糸状菌に対して低毒性で高い変異率を与える実績がある。1 次スクリーニングとして、得られた 02T6 株の変異株ライブラリを、各種選択圧に供し、生き抜いた株を取得した。選択圧として、フマラーゼ強化、副生産物のエタノール低減、菌糸形状の改変、浸透圧耐性、等を狙った化合物を使用した。

Rhizopus 属は、菌体をペレット化する発酵により、有機酸を高生産する [2)]。そのため、ペレットの形態がフマル酸の生産に強く関わっており、ペレットや、ペレットを構成する菌糸の形状が変化することで、フマル酸の生産性が向上するのではないかと考えた。このことを踏まえ、2 次スクリーニングとして大量の変異株の中から、菌糸の形態が変化した株を中心に選抜し、それらの株に対し、3 次スクリーニングとして、100 g/L のグルコースを含む液体培地にてペレット化菌体を用いたフマル酸生産性の評価をおこなった。

【結果】

育種の結果、様々な表現型を持つ株が得られ、中には寒天培地において菌糸を周囲に広げず、発酵生産において綺麗なペレットを形成する株があった。本育種株は、フマル酸の対糖収率が 44%であり、親株（収率 28%）の 1.6 倍であった。その他、ペレットの密度が低い育種株や、フマル酸の生産速度の高い育種株も確認された。*R. delemar* の育種改良において、株の形態変化に着目した育種が、発酵生産のポテンシャルを向上させた株の取得に繋がった。このような株の特徴の変化に着目する育種は、糸状菌だけではなく、他の微生物の育種をする際にも応用が可能である。

1) Furusawa M *et al*., *Genetica*, **102-103**, 333-347 (1998)

2) 特許 6189071 号

fumaric acid fermentation, production improvement, fungi

講演番号：3A07p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A07 会場

高濃度・高分子量ヒアルロン酸発酵生産のメカニズムの解析

Analysis of the mechanism of fermentative production of high concentration and high molecular weight hyaluronic acid

○成田 琴美[1]、井上 和幸[1]、村上 紀里子[2]、郡 彩子[2]、武内 章[1]([1]キユーピー株式会社 研究開発本部、[2]株式会社ちとせ研究所)
○Kotomi NARITA[1], Kazuyuki INOUE[1], Kiriko MURAKAMI[2], Ayako KORI[2], Akira TAKEUCHI[1]
([1]Kewpie.co.jp, [2]Chitose Laboratory Corp.)

【背景と目的】

ヒアルロン酸（HA）は N-acetyl glucosamine と Glucuronic acid の繰り返し結合からなる多糖類である。高い保水性や粘弾性を活かして、医療分野や粧食分野に幅広く利用されている。従来、鶏冠等から抽出されてきたが、近年では微生物発酵による生産への需要が高まっている。もともと HA 生産能力を持つ GroupA、C の Streptococcus や、HA 生産遺伝子を導入した Bacillus や Lactococcus 等での発酵生産研究が行われている。

微生物発酵法では、鶏冠抽出法に比べて HA の分子量が低く、3MDa を超える HA は遺伝子操作なくしては達成できていない。[1)] もしくは 0.1%に満たないわずかな生産量しか得られていない。[2)]

HA の分子量を上げる培養面での試みとして、酸素供給の増大[3)]、生育阻害[4)]、前駆体のバランス改善[5)]などの効果が報告されている。そこで、当社の保持する高い HA 生産能力を持つ株を元に、突然変異による代謝の改良を行い、高分子量および高生産株が得られないか、研究を行った。

【結果】

不均衡変異導入法により取得した HA 生産株の育種株は、高濃度や高分子量のヒアルロン酸を生産する能力を有していた。5L ジャーファーメンターの発酵試験では、元株を超える高濃度の HA 生産や、3MDa を超える高分子量 HA の生産が確認できた。

高濃度・高分子量生産のメカニズムを、菌体増殖、生産物、代謝フラックスの観点から元株と比較解析した。培養液あたりの糖消費量は同等であったが、菌体数、乳酸生産量が 1／3 に減少し、HA 生産量が 3 割増加していた。1 菌体あたりで比較すると、乳酸生産量は同等だが、糖消費量、酢酸生産量、HA 生産量が 3～4 倍に増加していた。菌体内メタボローム解析の結果、解糖系が活性化されていること、Acetyl-CoA を消費する物質を多く作っていること、UDP-N-acetyl glucosamine への代謝経路が活性化されていることなどが示唆された。

1) *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;**98**:6947-56.
2) キッコーマン株式会社. 高分子ヒアルロン酸の製造方法. 特開 2017-112901. 2017. 06. 29
3) *J Microbiol Biotechnol*. 2009;**19**:299-306.
4) *Bioresource Technology*. 2014;**163**:222-227.
5) *Molecular Biotechnology*. 2014; **56**:147-156.

hyaluronic acid, fermentation, metabolism

発表責任者：成田琴美（kotomi_narita@kewpie.co.jp）

講演番号：3A07p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A07 会場

Lactobacillus GG 発酵乳のメタボローム解析
Metabolomics of milk fermented with *Lactobacillus* GG
○山崎 和幸、原田 岳、依田 一豊、宮澤 賢司、平松 優、何 方（タカナシ乳業（株）商品研究所）
○ Kazuyuki YAMAZAKI, Gaku HARATA, Kazutoyo YODA, Kenji MIYAZAWA, Masaru HIRAMATSU, Fang HE (Takanashi Milk Products Co., Ltd.)

【目的】
Lactobacillus GG 株（LGG）は生きたまま腸に届き、長くとどまって、腸内環境を整えるばかりでなく、肌荒れやアトピー、花粉症などの予防・改善に関する研究が報告されている。プロバイオティクスとしての機能の発現には腸内での代謝産物が重要な役割を果たしているが、代謝産物を網羅的に解析することは作用機序の解明だけでなく、新たな生理機能を探索する上でも有効である。そこで本研究では、LGG で発酵した発酵乳中の低分子代謝産物についてメタボローム解析を行い、成分について解析すると共に、比較対象として市販のヨーグルトに含まれる代謝産物についても調べた（委託先：ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社）。

【方法】
LGG 発酵乳並びに市販のヨーグルト 2 種類を試料とした。内部標準物質の濃度が 10μM となるように調製した 900μL のメタノール溶液に、100μL の試料を添加して撹拌した。これに 1,000μL のクロロホルム及び 400μL の Milli-Q 水を加えて撹拌し、遠心分離（2,300×g、4℃、5 分）を行った。遠心分離後、水層を限外ろ過チューブに 400μL×2 本移し取った。これを遠心（9,100×g、4℃、120 分）し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 25μL の Milli-Q 水に溶解して CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定に供した。

【結果及び考察】
メタボローム解析の結果、3 種類の発酵乳から 164 のピークが検出され、網羅的に代謝産物を同定することができた。主成分分析したところ、LGG 発酵乳の代謝産物は、他の 2 種類とは異なる位置にプロットされ、特に第 1 主成分ではパントテン酸とグリセリン酸が因子負荷量として大きな値を示した。階層的クラスタリングの結果においても、LGG 発酵乳及び市販のヨーグルト 2 種類間にはそれぞれ代謝産物の種類において明確な差異があり、発酵に使用される乳酸菌の菌種や菌株の違いにより代謝産物に違いが生じることが確認された。本研究で得られたデータを元に、LGG 発酵乳中に特徴的に含まれる代謝産物を詳細に解析することで、LGG 発酵乳としての機能性や、腸内における保健効果の作用機序の解明に役立つと考えられた。

Lactobacillus GG, Metabolomics, Yogurt

講演番号：3A07p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A07 会場

好気代謝の改変による *Corynebacterium glutamicum* での効率的ピルビン酸生産
Efficient production of pyruvate by *Corynebacterium glutamicum* mutants with altered aerobic metabolism

○片岡 尚也[1,2]、VANGNAI Alisa S.[3]、藥師 寿治[1,2]、和田 大[4]、横田 篤[4]、松下 一信[1,2]（[1]山口大院創成科学、[2]山口大中高温微セ、[3]チュラロンコン大、[4]北大院農）
○Naoya KATAOKA[1,2], Alisa S. VANGNAI[3], Toshiharu YAKUSHI[1,2], Masaru WADA[4], Atsushi YOKOTA[4], Kazunobu MATSUSHITA[1,2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ. RCTMR, [3]Chulalongkorn Univ., [4]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は, グルタミン酸やリジンといったアミノ酸の工業的発酵生産に用いられている産業微生物である。近年では, 本菌の代謝系を操作することで, 有機酸やアルコール, ジアミン類の高生産に関する報告もなされている。ピルビン酸は, 解糖系の最終産物であるとともに, 分岐鎖アミノ酸やクエン酸回路の燃料分子であるアセチル CoA の供給源となる重要な代謝中間体である。本研究では, *C. glutamicum* の好気代謝を改変することで効率的にピルビン酸を生産しうる菌株の構築に成功したので報告する。
【方法・結果】*C. glutamicum* ATCC 13032 株を親株として用いた。ピルビン酸の高生産を目指す場合, クエン酸回路への炭素流量を減衰させる戦略が有効である。RamA は, クエン酸回路を構成するクエン酸合成酵素やコハク酸脱水素酵素, フマル酸加水酵素, リンゴ酸:キノン酸化還元酵素等の発現を正に制御する包括的転写制御因子で, その欠損株では, クエン酸回路への流量抑制が期待された。そこで, *ramA* 欠損株 (Δ*ramA* 株) を作製し 222 mM のグルコースを含む最小培地でのフラスコ培養でピルビン酸生産を評価した。その結果, Δ*ramA* 株は, 親株と比較して最大で 1.8 倍のピルビン酸を生成し (34.1 mM vs. 19.8 mM), 更に, 優れた特徴として, 低いピルビン酸資化速度を示した。Δ*ramA* 株はこの時, 著量の乳酸, 酢酸を副生していたため, これらの生成に関与する遺伝子 (*ldhA*, *pqo*, *cat*, *pta-ackA*) を Δ*ramA* 株で欠損させた DG5 株を作製し, 再度評価を行った。その結果, 乳酸, 酢酸生成が抑制され, ピルビン酸収量 111 mM を得た。更なる生産改善を行うべく, 還元的クエン酸回路により副生したと考えられるフマル酸, コハク酸生成の最小化を検討した。まず, オキサロ酢酸の還元に用いられる NADH 量を低下させることでの還元的クエン酸回路への流量低下を狙い, DG5 株で II 型 NADH 脱水素酵素を高発現させ評価を行った。しかし, ピルビン酸収量は変化せず, 予想と反し, フマル酸, コハク酸生成が亢進した。これは, II 型 NADH 脱水素酵素の高発現により, キノール供給が増加し, その結果として, キノールを還元力として利用するコハク酸脱水素酵素によるフマル酸のコハク酸への還元が活性化したことに起因すると考えられた。そこで, キノール酸化の強化が還元的クエン酸回路への流量を抑制すると考え, DG5 株でシトクロム *bd* 酸化酵素を高発現させ評価を行った。その結果, フマル酸, コハク酸の生成が抑制され, ピルビン酸収量は 133 mM へと増加した。本構築株を用いて, 556 mM のグルコースを含む最小培地で pH 7.0, 対数増殖後の溶存酸素量を飽和量の 1-4%に制御した培養条件で発酵試験を行ったところ, 40 時間の培養で 341 mM のピルビン酸を生成することに成功した。

Corynebacterium glutamicum, pyruvate, aerobic metabolism

発表責任者：片岡尚也（nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A07p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A07 会場

酵母におけるフィードバック阻害非感受性型アセトヒドロキシ酸合成酵素の発現によるバリン高生産

High-level production of valine by expression of the feedback inhibition-insensitive acetohydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*

Natthaporn TAKPHO、渡辺 大輔、○高木 博史（奈良先端大バイオ）
Natthaporn TAKPHO, Daisuke WATANABE, ○Hiroshi TAKAGI (Nara Inst. of Sci. Tech.)

分岐鎖アミノ酸の一種であるバリンは、哺乳類では必須アミノ酸であることから、飼料やサプリメント、抗ウィルス薬の原料などに広く用いられている。現在、バリンは主に大腸菌や *Corynebacterium* 属細菌を用いた発酵法により生産されているが、食品として高い安全性が認められている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いれば、有用性の高い技術になることが期待される。また、真核生物のモデルとしても知られる *S. cerevisiae* におけるバリンの合成制御機構と生理記役割の解明は、高等生物における研究にも貢献すると考えられる。そこで本研究では、バリン合成を制御している鍵酵素であるアセトヒドロキシ酸合成酵素（AHAS）に着目し、*S. cerevisiae* での機能解析を行った。

酵母の AHAS は、触媒サブユニット Ilv2 および調節サブユニット Ilv6 から成り、Ilv6 にバリンが結合することにより AHAS 活性が阻害されると推測されている。これまでに、大腸菌の AHAS においてバリンによるフィードバック阻害を解除するアミノ酸置換が複数同定されていることから、酵母の Ilv6 上における相同なアミノ酸残基の置換が AHAS 活性に及ぼす影響を解析した。その結果、バリンとの結合領域である ACT ドメイン上の N86A，G89D，N104H 置換体を発現する株では、バリンの毒性アナログであるノルバリンに対する耐性が野生型株よりも上昇し、細胞内バリン含量も著しく増加していた。一方で、他の分岐鎖アミノ酸（ロイシン・イソロイシン）の含量には影響を及ぼさなかったことから、酵母における分岐鎖アミノ酸の合成経路は共通であるにも関わらず、合成制御機構は各アミノ酸で独立している可能性が示された。

さらに、酵母の Ilv2 および Ilv6 を大腸菌の組換えタンパク質として調製し、*in vitro* 再構成系を用いて AHAS 活性を測定したところ、N86A，G89D，N104H 置換がバリンによるフィードバック阻害を解除することが明らかになった。以上の結果から、AHAS のフィードバック阻害機構が生物間で広く保存されていることが示された。しかしながら、大腸菌では ACT ドメインに加え、カルボキシル末端側の ALS_ss_C ドメイン上のアミノ酸置換もフィードバック阻害を解除したが、酵母では該当するアミノ酸置換はバリン合成に影響を及ぼさなかった。このことから、原核生物と真核生物における ALS_ss_C ドメインの機能の違いが示唆された。

以上、本研究で得られた知見は、真核生物におけるバリン合成の制御メカニズムの理解や、酵母を用いたバリンの発酵生産技術に繋がる有用なものであると考えられる。

valine, yeast, acetohydroxyacid synthase

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：3A08a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A08 会場

酢酸菌を宿主とした異種タンパク質発現系の構築
Trial of heterogeneous gene expression in acetic acid bacteria

○繁 宥樹[1]、東久保 遥[1]、石井 友理[1]、赤坂 直紀[2]、佐古田 久雄[2]、秀瀬 涼太[1]、藤原 伸介[1]([1]関学大理工、[2]マルカン酢(株))
○Yuki SHIGE[1], Haruka HIGASHIKUBO[1], Yuri ISHI[1], Naoki AKASAKA[2], Hisao SAKODA[2], Ryota HIDESE[1], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar, Co. Ltd)

【目的】酢酸菌は細胞膜結合型脱水素酵素によりエタノールを酸化し、酢酸を生産することで生育するため、培養液中の雑菌の繁殖を抑えることができる。中でも酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は通気撹拌培養が可能であり、十分な菌体収量を確保することができる。本菌には 3 種の内在性プラスミドが存在し、遺伝子操作系も確立している(1)。これらの背景から本菌は物質生産のための宿主となると期待した。ところが、本菌の細胞内 pH は不明であったため、まず本菌の細胞内 pH の変動を明らかにすることを目的とした。pH 感受性 GFP を用い、各生育段階の pH 変動を観察した。次に大腸菌のβガラクトシダーゼをモデルタンパク質として *K. europaeus* での発現実験を行なった。
【結果と考察】先行研究(2)の知見に基づき、オワンクラゲの GFP タンパク質遺伝子を酢酸菌のコドン利用頻度に改変した pH 感受性 GFP（pHluorin2）を構築した。pHluorin2 を 2 点の励起波長（400 nm 及び 480 nm）に対する蛍光強度を測定し、pH 5-9 の範囲で pH 依存的な蛍光強度の変化を確認した。次に、pHluorin2 発現プラスミドを大腸菌及び酢酸菌に導入し、各生育段階における細胞内 pH の経時的変化を調べた。大腸菌では、対数期から定常期にかけて細胞内の pH は 6-7 で著しい変化は認められなかったのに対し、*K. europaeus* では、対数増殖期では pH 6 であり、定常期に入ると pH 5 に低下した。また、伝統的な食酢醸造法（静置発酵法）に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pateurianus* においても検証したところ、同様の挙動を示した。一方、細胞外 pH に着目すると、対数期から定常期にかけて *K. europaeus* は pH 6 から 2.5 まで低下するのに対し、*A. pateurianus* では pH 3 に留まっていた。酢酸菌 2 種の培地中に含まれる有機酸及び揮発性成分を分析したところ、両株共に対数期後期以降、エタノールの消費に伴い酢酸が蓄積し、*K. europaeus* のみ同時期にグルコン酸が顕著に蓄積していた。これらのことから、2 種間での細胞外 pH の差はグルコン酸蓄積の有無に起因すると考えられる。
　次に *K. europaeus* を宿主とし、大腸菌のβガラクトシダーゼをプラスミドを介して発現させた。対数期から定常期初期にかけてβガラクトシダーゼ活性が見られたが、更に培養を続けると活性は著しく低下した。また *K. europaeus* 中で、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の分子シャペロニン CpkB(3) を共発現させたところ、定常期後期における活性の低下が解消された。これは、細胞内 pH の低下に伴い酸変性されたβガラクトシダーゼが、CpkB により補足されたためであると考えられる。
【引用文献】(1) Akasaka, N. et al., J. Biosci. Bioeng., 119, 661-8, (2015). (2) Mahon, M. J., Adv. Biosci. Biotechnol., 2, 132-7, (2011). (3) Gao, L. et al., J. Biosci. Bioeng., 124, 283-8, (2017).

Acetic acid bacteria, Intracellular pH, Expression system

講演番号：3A08a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A08 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてタンパク質発現を増強させるイントロン配列の解析
Analysis of the intron sequences enhancing protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*
○後藤 聡志、近藤 真樹、星田 尚司、赤田 倫治（山口大院・創成科学・化学系）
○Satoshi GOTO, Masaki KONDOU, Hisashi HOSHIDA, Rinji AKADA (Dept. Appl. Chem., Yamaguchi Univ.)

イントロンは真核生物の遺伝子配列中に存在し、DNAが転写されてできたmRNA前駆体が成熟mRNAになるときに、スプライシングによって削除される配列である。イントロンを持つ遺伝子は非常に多く、例えばヒトの遺伝子の95%がイントロンを持つ。イントロンは選択的スプライシングによるタンパク質の多様化や進化上の重要性をもつという考え方はよく知られている。これまでに、*Saccharomyces cerevisiae*がもつ*RPS25A*遺伝子の5'-非翻訳領域(UTR)にあるイントロンを*TDH3*プロモーターとルシフェラーゼの開始コドンの間に挿入することでルシフェラーゼの発現を増強することを明らかにした。そこで、本研究では、このメカニズムを明らかにするために、発現増強に重要なイントロン配列の解析を行った。

*RPS25A*のイントロンは327 bpと長いので、配列解析を行うのは時間がかかると考えた。そこでまず、*S. cerevisiae*がもつ、100 bp以下の短いイントロン8種類を用いて、これらでもタンパク質を発現増強できるか調べた。その結果、どのイントロンも本来はコーディング配列中のイントロンであるが、*TDH3*プロモーターの下流で開始コドンの上流の5'-UTRに挿入しても発現増強を示すことがわかった。8種類のイントロン中でも、最も強く発現を増強し、63 bpしかない*QCR10*遺伝子のイントロンを用いてルシフェラーゼ活性を指標に発現増強に必要な配列の解析を行った。イントロンは5'末端に位置するGT、3'末端のAG、ブランチポイントであるAというコンセンサス配列を持っている。さらに、*S. cerevisiae*においてはこれらの周辺配列も保存性が高い。保存性の高い配列を残して、配列削除による解析を行うと、26 bpまで短くしても全長と同レベルの発現増強を示した。この26 bp中の発現増強に重要な配列を調べるために、コンセンサス配列へ変異を与えた。その結果、真核生物のイントロンのコンセンサス配列の一つである3'末端AGのAをTに変えても全長と同レベルの発現増強を示した。これらの結果から、発現増強にスプライシングが必ずしも必要とは限らないということが示唆された。

intron, 5'-UTR, expression enhancement

発表責任者：星田尚司（hoshida@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A08a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A08 会場

新規補助遺伝子付きピキア酵母用遺伝子破壊カッセットの構築

A new type gene-disruption cassette with a rescue gene for *Pichia pastoris*

○渋井 達郎（日本獣医生命科学大学)
○TATSURO SHIBUI (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

ピキア酵母は増殖力およびタンパク質生産能力が優れているため、組換え宿主として様々なタンパク質の生産に利用されている。

当研究室では、目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法を用い、ピキア酵母での目的タンパク質の生産効率向上の検討を行ったが、ベクター上で目的遺伝子数を増やした場合、導入遺伝子断片が巨大になるため、エレクトロポレーション法による細胞内へのインタクトな遺伝子の導入効率は著しく低下することを見出している[1)]。

よって、ピキア酵母を工学的に改変し、同じベクターを繰り返し導入できる系を開発し、既に報告している[2)]。

前回の本大会では、*Cre*-変異 *lox*P システムを利用し、様々なピキア酵母株に使用可能な再利用可能汎用ベクター系を開発し報告している[3)]。

一方、ピキア酵母に関して様々な遺伝子変異株が取得され報告されている。しかし、演者のように変異株取得の経験がない者では、文献情報のみでの同様な変異株取得は必ずしも容易なものではないと実験を通し痛感している。

今回は、前回本大会で報告の再利用可能汎用ベクターを用いて、ピキア酵母用遺伝子破壊カセットをＰＣＲ法にて作製し、モデル遺伝子（*ade*2）にてその遺伝子破壊効果を検証したので報告する。

１) T Shibui *et,al.*“ Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.”
CIBTech Journal of Biotechnology, 3, 25-35 (2014)
２) T Shibui *et,al.* “Engineering a Pichia Pastoris strain capable of incorporating repeated DNA constructs with the same selectionmarker”
CIBTech Journal of Biotechnology, 4, 1-11(2015)
３) T Shibui *et,al.*“ A New Efficient Vector for Repeated Use in *Pichia pastoris*.”
International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(9), 72-79 (2015)

Pichia pastoris, gene-disrupton, *ade2*

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

講演番号：3A08a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A08 会場

Pichia pastoris を用いた Affibody と Nanobody の生産

Production of Affibody and Nanobody by *Pichia pastoris*

○宮本 佳奈、三浦 夏子、大谷 優太、柳沼 謙志、青木 航、植田 充美（京大院農）
○Kana Miyamoto, Natsuko Miura, Yuta Otani, Kenshi Yaginuma, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda (Kyoto Univ.)

【背景と目的】

抗体はガンなどの疾患の研究や診断、治療において非常に有用なタンパク質である。しかし、抗体は非常に高価であり、安価な生産方法の確立が求められている。また、多様な抗体の生産の場合にはスクリーニングに時間がかかる。そこで、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて安価に抗体を作成し、ハイスループットにスクリーニングを行うシステムの確立を目指す。

【方法と結果】

本研究では、単一のドメインから成り、抗体と同様に目的とする抗原に強く結合するタンパク質であることが知られている Affibody と Nanobody[1]の生産を行った。モデルとして、まず、配列が既知である CD4 Affibody と CD4 Nanobody の生産を試みた。タンパク質分泌生産用のプラスミドである pPIC9K に Affibody および Nanobody の配列を組み込み、*Pichia pastoris* の形質転換を行った。得られたコロニーを培養し、培養上清を用いて SDS-PAGE を行い、生産量の高い酵母のスクリーニングを行った。絞り込んだ高生産酵母では、高レベルの抗体生産を達成した。生産した Affibody と Nanobody を用いて結合活性の評価も行った。また、新しく表面抗原の異なる培養細胞を用いた評価系を構築したので、結果をまとめて報告する[2]。

[1] J Helma et al., 209 (5): 633-644, 2015
[2] Miura et al., submitted

Pichia pastoris, antibody production, Affibody

講演番号：3A08a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A08 会場

高純度組換え体ラット膵臓カルボキシペプチダーゼ製剤の作出

Production of high-purity recombinant rat pancreatic carboxypeptidase

○前田 浩[1]、村山 和隆[2]、渡邉 君子[3]、後藤 昌史[4]、山形 洋平[1] ([1]東京農工大応生化、[2]東北大院医工学、[3]東北大学未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院医・移植再生医学)
○Hiroshi MAEDA[1], Kazutaka MURAYAMA[2], Kimiko WATANABE[3], Masafumi GOTO[4], Youhei YAMAGATA[1] ([1]Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Biomedical Enginnering, Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ., [4]Transplantation and Regenerative Medicine, Tohoku Univ)

【背景】　膵島移植とは、1 型糖尿病に対する治療法の一つである。ドナー膵臓より、酵素を用いて細胞外マトリックスタンパク質を分解し、インスリンを産生するβ細胞を含む膵島のみを分離し、レシピエントの肝内門脈にカテーテルによって注入・生着させる細胞移植に分類される低侵襲な治療法である。膵島の移植・生着により血糖値に応じてインスリンが分泌され、インスリン注射から離脱できることによる QOL の向上が見込め、糖尿病の根治療法となる。この膵島移植の成否は膵臓から良質な膵島を大量に分離できるか否かにかかっている。

これまで膵島分離には *Clostridium histolyticum* の培養上清から調製された collagenase I/II、neutral protease、clostripain が含まれる collagenase 製剤が用いられてきた。Neutral protease としては、安定であり低価格という理由から世界的に thermolysin が頻用されてきた。我々はこれまでに *C. histolyticum* 由来の 4 種のペプチダーゼについて臨床用組換え体酵素製剤を取得できており、その使用量比の改変などにより膵島分離効率の量的問題は解決を図ってきたが、膵島の質を低下させる原因の特定には至っていない。

【目的・方法・結果】　分離膵島の viability を低下させる要因として、分離時に膵外分泌組織より遊離する膵 trypsin の影響が考えられてきたが、我々は trypsin 活性がトリガーとなり活性化される膵外分泌加水酵素群の中に膵島に対する直接的障害因子が存在すると推定している。しかし市販の膵加水分解酵素製剤は、膵臓から直接精製することにより trypsin などの多くの加水分解活性が夾雑しており、個々の外分泌加水分解酵素が膵島に与える影響を検討するには高純度組換え体加水分解酵素製剤の大量取得が必要となる。

そこで我々はプラットフォームの構築を目的として、まず膵外分泌組織に豊富に含まれる carboxypeptidase（CPase）に着目し、*Pichia pastoris* を宿主とした Rat 膵 CPase の発現系を構築し、プロモーターの変更による発現量の向上を試みた。その結果 Rat CPaseA1, A2, B1 の 3 種の pro-体としての培養上清への高発現を確認した。次いで trypsin による限定分解により活性化した CPase 製剤中より trypsin を除去することで、他のペプチダーゼ活性が夾雑しない CPase 製剤の作出に成功した。

carboxypeptidase, *Pichia pastoris*, purification

発表責任者：前田浩（hmaeda@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3A08a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A08 会場

Aspergillus nidulans のセクレトーム解析から見出された新規ガラクタン分解酵素
Novel galactan-degrading enzyme discovered by secretome analysis of *Aspergillus nidulans*
○鈴木 裕満[1]、酒井 杏匠[1]、新沢 祐大[1]、鈴木 健吾[1]、糀谷 紗季[1]、山口 愛彩[1]、松江 渚[1]、高須賀 太一[2]、堀 千明[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]北大農)
○Hiromitsu SUZUKI[1], Kiyota SAKAI[1], Yuta SHINZAWA[1], Kengo SUZUKI[1], Saki KOJIYA[1], Aya YAMAGUCHI[1], NAGISA MATSUE[1], Taichi TAKASUKA[2], Chiaki HORI[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Univ. of Hokkaido)

【目的】
糸状菌 *Aspergillus nidulans* は Starch、Cellulose、Hemicellulose の分解能を有していることから、それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御について盛んに研究が行われている。本研究では、種々の多糖類（Microcrystalline cellulose (MCC)、Carboxymethyl cellulose (CMC)、Chitin、Xylan、Glucomannan、Galactomannan）のみを炭素源として生育させた際に *A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質についてセクレトーム解析を行った。また、同定されたタンパク質の中で、機能が既知のタンパク質とはアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さない 6 種の機能未知タンパク質（HP1-6）を選抜し、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* に異種発現させた。組換え HP を精製し、種々の多糖を基質にして反応させることで HP の機能を解析した。

【方法・結果】
種々の多糖を炭素源にして培養した *A.nidulans* の培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。トリプシン処理後、LC-MS/MS にてセクレトーム解析したところ、MCC、CMC、Chitin を炭素源にして生育させたものと比較して、Xylan、Glucomannan、Galactomannan を炭素源にした場合、多種類のタンパク質が生産されていた。総数で 578 種のタンパク質が同定され、そのうちの 82 種が HP であった。その中から、6 種の組換え HP を調製し、種々の多糖を基質にして酵素活性を測定した。その結果、1 種の HP (HP1) が Rhamnogalacturonan I に対して分解活性を有することがわかった。Rhamnogalacturonan I を構成する多糖成分である Polygalacturonic acid、α-1,5-Arabinan、β-1,3-Galactan、β-1,4-Galactan を基質にして酵素活性を測定したところ、β-1,4-Galactan を基質にした場合、還元糖量が増加した。MALDI-TOF-MS により分析したところ、162 m/z 間隔で反応産物由来のピークが検出された。このことから、HP1 によりβ-1,4-Galactan が Galactose、Galactobiose、Galactotriose、Galactotetraose、Galactopentaose、Galactohexaose に変換されていることが示された。HP1 は、CAZy に登録されているどの Glycoside Hydrolase family (GH) にも属さない、新規のβ-1,4-Galactanase であることが判明した。現在、HP の詳細なβ-1,4-Galactan の分解機構及び HP の生理学的役割を解析している。

Aspergillus nidulans, Galactanase, Secretome analysis

発表責任者：鈴木裕満（chupacabra821@gmail.com）

講演番号：3A08a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A08 会場

Aspergillus saitoi が生産するペクチン分解酵素の探索と機能解析
Screening and characterization of pectin-degrading enzymes from *Aspergillus saitoi*
○上條 順也[1]、酒井 杏匠[1]、村田 俊輔[1]、志水 元亨[1]、和久 豊[2]、小林 哲夫[3]、加藤 雅士[1]([1]名城大農、[2](株)ビオック、[3]名大院生命農)
○Junya KAMIJO[1], Kiyota SAKAI[1], Shunsuke MURATA[1], Motoyuki SHIMIZU[1], Yutaka WAGU[2], Tetsuo KOBAYASHI[3], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Bio'c., [3]Nagoya Univ.)

【目的】
植物細胞壁に含まれているペクチンはセルロースと密に絡み合って存在している。ペクチンを除去することによりセルロースを効率的に分解できるため、稲わら・麦わら・廃材などを原料としたバイオリファイナリーにおいて、多様な特性をもつペクチン分解酵素が重要である。そこで我々は、安全性が高く様々な産業用酵素の生産に優れた麹菌（黄麹菌、黒麹菌、白麹菌）から新しいペクチン分解酵素を探索し、その機能を解析した。
【方法・結果】
食品産業に利用され、ペクチン分解能を有する *Aspergillus* 属糸状菌から 16 の菌株を選抜した。ペクチンを唯一の炭素源として培養し、得られた培養上清を用いてプレートアッセイを行った結果、*A. saitoi* KBN 2022 株が高いペクチン分解能を有していた。この菌株の培養上清を二次元電気泳動に供したところ、ペクチン誘導的に多数の細胞外タンパク質が発現していた。MALDI-TOF/TOF-MS 解析からペクチン分解に関わる酵素がいくつか同定された。この中で、ペクチン酸リアーゼ（*A. saitoi* pectate lyase; AsPelA）についてさらに検討した。*A. saitoi* から AsPelA のクローニングを行い Blast 検索したところ、*A. kawachii* が生産するペクチン酸リアーゼ（*A. kawachii* pectate lyase; AkPelA）と 99% 一致しており、140 番目と 197 番目の 2 つのアミノ酸残基が異なっていた。そこで、AsPelA とその変異型酵素（I140V と V197D; すなわち AkPelA）を *Pichia pastoris* にて異種発現させ、それぞれのリコンビナントタンパク質を調製し、機能を解析した。至適 pH および pH 安定性に違いはなかった。熱安定性は、AsPelA は 70°C で 30 分間のインキュベート後 55% の残存活性を有していたが、AkPelA は 60°C で 30 分間のインキュベートで失活した。このことから、AkPelA と異なる AsPelA 中の 2 つのアミノ酸残基（I140 と V197）が熱安定性に寄与していることが示唆された。

pectate lyase, *Aspergillus saitoi*, thermostability

発表責任者：加藤雅士（mkato@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3A08a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A08 会場

半連続培養による *Trichoderma reesei* 由来繊維質糖化酵素の長期安定生産系の構築

Semi-continuous cultivation systems of *Trichoderma reesei* for long-term/stable production of saccharification enzymes for lignocellulosic materials

○池 正和、田伏 美峰、徳安 健（農研機構・食品研）
○Masakazu IKE, Mine TABUSE, Ken TOKUYASU (FRI, NARO)

我々は、新たな産業創出等により地域農林水産業の活性化に繋げるべく、多様な地域バイオマス資源を高度利用するための技術開発を進めている。繊維質資源の有効利用技術として酵素糖化による細胞壁多糖類の可溶化・低分子化技術は、繊維質資源を有効活用していく上で重要であるが、酵素コストが高く実用化に向けた大きな障壁となっている。これを解決すべく、糖化酵素の生産・利用に関して総合的に取り組んでおり、酵素製造に関して、セルラーゼ生産微生物 *Trichoderma reesei* のグルコース抑制解除株を用いた可溶性炭素源からの効率的酵素生産基盤技術を構築している[1), 2)]。本法は、酵素生産原料として可溶性糖質を用い、それらの組成・添加量等をコントロールしつつ酵素生産培養を行うことで、高生産速度維持及び酵素組成制御を可能とするものである。可溶性糖質のみを酵素製造原料とすることで、培養の連続化、原料の滅菌工程簡略化、培養条件の維持制御が容易になる等のメリットがある。本研究では、上記培養系の特性を活かした半連続培養時による糖化酵素の長期安定製造システムの構築・高度化を目的としている。主要炭素源としてのグルコース（G)、セルラーゼ誘導物質としてのセロビオース（C2）を供給糖源として用いた、上記培養系での酵素生産特性を評価した結果、単位期間毎に糖液流加による増量分を抜き取ることで培養液量を管理しながら半連続培養を行うことで、糖化酵素を長期間効率的に生産できることが明らかとなった。初期液量 3L の培地に対して、糖質混合液(10% G + 2.0% C2)を供給速度 450-500 mL/日(54-60 g 炭素源/日)で連続供給し、1 日毎に 450-500 mL の培養液排出を行う系で 30 日間の半連続培養を実施したところ、培養 7 日目以降にタンパク質濃度・セルラーゼ濃度等がほぼ一定となり、安定的な半連続生産期間に達した。半連続生産期間中（培養 8 日目～30 日目）のタンパク質濃度は 40～50 g/L、投入炭素源あたりのセルロース分解酵素生産効率は 270 - 310 FPU(濾紙分解活性)/g-炭素源であり、ほぼ一定品質（約 30FPU/mL）の酵素液が、1 日毎に一定量（約 450mL）得られた。本発表では、長期培養生産時における菌体状態の解析結果や菌株改良の現状などについても併せて紹介する。

1) Ike M, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 2059-2066 (2010)
2) Ike M, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 161-166 (2013)

cellulase, enzyme production, *Trichoderma reesei*

発表責任者：池 正和（mikegogo@affrc.go.jp）

講演番号：3A08a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A08 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* においてチューブリン遺伝子欠損はタンパク質生産性を向上させる
Deletion of α-tubilin gene in *Trichoderma reesei* causes high protein productivity

○柴田 望[1]、掛下 大視[1]、志田 洋介[2]、五十嵐 一暁[1]、瀧村 靖[1]、小笠原 渉[2] ([1]花王・生科研、[2]長岡技科大・生物)
○Nozomu SHIBATA[1], Hiroshi KAKESHITA[1], Yosuke SHIDA[2], Kazuaki IGARASHI[1], Yasushi TAKIMURA[1], Wataru OGASAWARA[2] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

【背景・目的】食糧と競合しないセルロース系非可食バイオマスを効率的に利用していくためには、より高効率な糖化酵素をより安価に獲得していくことが必要不可欠である。糸状菌 *Trichoderma reesei* は多様な糖化酵素を菌体外に多量に分泌生産することから、糖化酵素の生産宿主として広く利用されている。日本においても標準株 QM9414 から複数回の変異導入によって高生産変異株が作出されているが、産業利用を行う上では更なる酵素生産性の向上や、カタボライト抑制の解除、炭素源の利用効率の向上などが必要とされる。本検討では、これまでに構築してきた高糖化性酵素生産株に関して酵素生産性の評価を行った結果、*Aspergillus aculeatus* 由来βグルコシダーゼ発現株である JN13 株において高い酵素生産性が確認された。そこで、本株について詳細な解析を行い、生産性が向上した因子の解明を行うこととした。
【方法・結果】これまでに作製してきた高糖化性酵素生産株について、ジャー培養にて酵素生産性の評価を行った。その結果、*A. aculeatus* 由来βグルコシダーゼを発現させた株では JN13 株を除き全ての株において酵素生産性が低下していたのに対し、JN13 株でのみ酵素生産性が向上していることが明らかとなった。そこで、本株についてゲノム解析を行い、組換え DNA の挿入箇所を解析した結果、αチューブリンをコードする遺伝子(*tubB*)上に DNA 断片が挿入されており、αチューブリンの機能欠失が起こっていることが示唆された。そこで、*tubB* 破壊株を構築し、酵素生産性及び培養挙動解析を行った。その結果、*tubB* 破壊株はセルロースのみを炭素源とした場合に、親株と比較して約 1.2 倍の酵素生産性を示した。また、様々な炭素源を用いて培養検討を行った結果、*tubB* 破壊株は通常では酵素が生産されない高濃度グルコース含有培地においても効率的に酵素生産が可能であることを見出した。

Trichoderma reesei, cellulase, tubulin

発表責任者：瀧村 靖（takimura.yasushi@kao.com）

講演番号：3A08a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A08 会場

T. reesei のセルラーゼ生産性を向上させるβ－グルコシダーゼの変異

Mutation of beta-glucosidase for cellulase production of Trichoderma reesei

○志田 洋介[1]、中村 彩奈[1]、服部 祥吾[1]、松沢 智彦[2]、矢追 克郎[2]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]産総研)
○Yosuke Shida[1], Ayana Nakamura[1], Shogo Hattori[1], Tomohiko Matsuzawa[2], Katusro Yaoi[2], Wataru Ogasawara[1] ([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]AIST)

セルラーゼを高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* においてセルラーゼ遺伝子群の発現は誘導的であり、セルロースが唯一の炭素源として存在するときにのみ観察される。基底レベルで微量に発現しているセロビオハイドロラーゼおよびエンドグルカナーゼの作用によりセルロースが分解されて生じるセロビオースと、β-グルコシダーゼ（BGL）の糖転移活性によりセロビオースから生じるソホロースがセルラーゼの誘導物質になっていると考えられているが、その詳細は不明である。

T. reesei 標準株 QM9414 を親株として突然変異誘発によって作出されたセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 は、基質にセロビオースを用いた際のセルラーゼ誘導生産能が強化された株である。そのため、セロビオースおよびソホロースによる *T. reesei* のセルラーゼ誘導メカニズムを解析するうえで鍵となる株である。比較ゲノム解析の結果から、PC-3-7 において細胞内β-グルコシダーゼである BGLII の４０９番目のアミノ酸 V が F に変異していることが明らかとなった。この変異を回復させたところ、セロビオースによるセルラーゼ生産性が低下した。さらに、QM9414 に変異型 BGLII を導入した場合にセルラーゼ生産性を強化できることが明らかとなっている。変異型 BGLII は加水分解活性が極めて低くなっているものの、糖転移活性が残存しており、セロビオースから誘導物質を生成しているのではないかと推測している。しかしながら、PC-3-7 で生じた BGLII の変異が最適なものであるのかどうかは定かではない。そこで本研究では、*T. reesei* のセルラーゼ発現誘導における BGLII の機能を明らかにすることを目的として、BGLII の変異箇所について飽和変異導入を行いその効果を評価した。

大腸菌を宿主として用い、PC-3-7 における BGLII の変異箇所を 20 種のアミノ酸にそれぞれ置換した BGLII を発現、精製し、HPLC および TLC を用いて糖転移産物の解析および酵素の諸性質についての解析を行った。これまでに野生型 BGLII を含め、１１種のアミノ酸置換 BGLII の発現に成功している。それらの中で、T に置換した BGLII は加水分解活性が野生型の２倍以上に向上し、糖転移活性では６糖以上のオリゴ糖を生成していることが明らかとなった。さらに、T 置換型 BGLII を *T. reesei* に導入すると F 置換型の BGLII を導入した時よりも高いセルラーゼ生産性を付与した。現在は、T 置換型 BGLII の酵素学的諸性質の解析を進めている。

Trichoderma reesei, gene regulation, cellulase

発表責任者：志田洋介（yshida@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3A08a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A08 会場

PET 分解酵素 Cut190 の Ca^{2+}結合に着目した機能構造解析

Structural and functional analysis of PET-hydrolyzing enzyme Cut190 and its mutants at Ca^{2+}-binding sites

○山上 由莉[1]、河合 富佐子[2]、織田 昌幸[1]（[1]京府大院・生環科、[2]京工繊大・繊科セ）
○Yuri YAMAGAMI[1], Fusako KAWAI[2], Masayuki ODA[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Inst. Technol.)

【背景・目的】クチナーゼはリパーゼ系統酵素で、幅広い基質のエステル結合を加水分解するため、難分解性のポリエチレンテレフタレート（PET）分解能を有する酵素として注目されている。中でも好熱性放線菌 *Saccharomonospora viridis* AHK190 株由来のクチナーゼ Cut190 は、Ca^{2+}存在下で酵素活性が上昇する他の同系酵素とは異なる特徴をもつ。X 線結晶構造解析の結果、Ca^{2+}結合部位は 3 ヶ所あり（下図中①、②、③ ）、①のループへの結合により大きな結合変化を起こす。本研究では、Cut190 の耐熱化変異体 S226P/R228S（Cut190*）、及び Ca^{2+}結合部位変異体を用い、Ca^{2+}濃度依存的な酵素活性と熱安定性の変化を解析した。

【方法】Cut190*を鋳型として、①から③の Ca^{2+}結合部位変異体を作製した。①：78 番目に Ser を挿入した 78S、②：salt bridge を導入した E184R、③：D250 と E296 をそれぞれ Cys にした S-S 変異体。これらを大腸菌発現系により発現・精製した。酵素活性測定の基質として、poly butylene succinate-*co*-adipate（PBSA）を用い、異なる Ca^{2+}濃度条件下で、37°C で 30 分間反応させ、吸光度により分解を測定した。円偏光二色性（CD）スペクトル測定を用いて、各 Ca^{2+}濃度における二次構造と熱安定性を解析し、変性中点温度（T_m）を算出した。

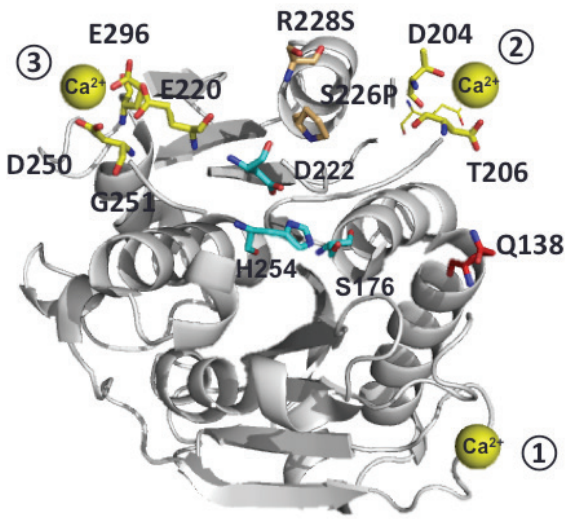


Figure Cut190*の Ca^{2+}結合部位モデル図

【結果・考察】Cut190*は Ca^{2+}非存在下で活性は無く、2.5 mM Ca^{2+}存在下で最大活性を示した。Cut190*の T_m は、2.5 mM Ca^{2+}添加により、~56°C から~13°C 上昇した。一方、①の変異体は、Ca^{2+}非存在下でも活性を示したが、T_m の挙動は Cut190*と同様であった。②の変異体は、Cut190*と比較して Ca^{2+}濃度依存的に活性と熱安定性は大きく変化せず、③の変異体は、Cut190*と同様に Ca^{2+}濃度依存的に活性は上昇したが、T_m は Ca^{2+}非存在下でも~80°C と高く、Ca^{2+}濃度依存的な顕著な上昇は見られなかった。以上より、①部位は活性化に関係し、②は安定性を補い、③は熱安定性に大きく関与すると考えられる。

PET-hydrolysing cutinase, Ca^{2+}-binding site mutation, thermal stability

講演番号：3A08a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A08 会場

PET 分解酵素クチナーゼの Ca^{2+}結合に伴う熱安定性と動的構造の変化
Thermodynamic and structural changes of PET-hydrolyzing enzyme Cut190 induced upon Ca^{2+} binding

○千賀 明香音[1]、山上 由莉[2]、稲葉 理美[2,3]、関口 博史[3]、宮ノ入 洋平[4]、河合 富佐子[5]、織田 昌幸[2]([1]京府大・生環、[2]京府大・院生環科、[3]高輝度光科学研究センター、[4]大阪大・蛋白研、[5]京工繊大・繊科セ)
○ Akane SENGA[1], Yuri YAMAGAMI[2], Satomi INABA[2,3], Hiroshi SEKIGUCHI[3], Yohei MIYANOIRI[4], Fusako KAWAI[5], Masayuki ODA[2] ([1]Kyoto Pref. Univ, [2]Kyoto Pref. Univ., [3]JASRI/SPring-8, [4]Osaka Univ., [5]Kyoto Inst. Technol.)

[要旨]Cut190 は、放線菌 *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来のクチナーゼであり、難分解性であるポリエチレンテレフタラート（PET）を加水分解する。Cut190 は Ca^{2+}存在下で酵素活性、熱安定性、ともに上昇することが知られており、一分子の Ca^{2+}が結合した Cut190 S226P 変異体の結晶構造から、同結合に伴い、構造変化が誘導されることが明らかになった。Cut190 の耐熱化変異体 Cut190* S226P/R228S（Cut190*）を用いた結果、2.5 mM Ca^{2+}存在下で最も活性が高く、Ca^{2+}濃度依存的に熱安定性が上昇することが明らかになった。さらに、Cut190*の不活性型、Cut190* S176A を用いた質量分析と結晶構造解析の結果、3 ヶ所の Ca^{2+}結合部位の存在が明らかにされた。本研究では、Cut190* S176A を対象に、Ca^{2+}結合が熱安定性と機能へ及ぼす影響を、溶液中での動的構造変化の観点から解明することを目的とした。

[方法・結果] N 末に His-tag を付加した Cut190* S176A を、Ca^{2+} free である M9 培地を用いて、大腸菌大量発現系で発現させ、Ni-NTA を用いて精製した。その後、プロテアーゼで His-tag を分離し、Cut190* S176A を精製した。本酵素の Ca^{2+}濃度依存的な熱安定性を調べるために、示差走査型カロリメトリーを用いて解析した結果、Ca^{2+}非存在下では、変性中点温度（T_m）は 54.4°C であった。Ca^{2+}濃度上昇とともに T_m は上昇し、250 mM Ca^{2+}存在下で最も高く、71.0°C であった。^{15}N 安定同位体で標識した試料を用いて二次元 NMR 測定を行い、Ca^{2+}滴定に伴う化学シフト変化を観測した。Ca^{2+}濃度 0、2.5、25、250 mM の 4 条件下で測定した結果、25 mM までの Ca^{2+}滴下に伴い、シグナル変化が観測され、Ca^{2+}濃度依存的に構造変化することが示唆された。また、Ca^{2+}濃度 0、2.5、25 mM の 3 条件下で、X 線小角散乱を測定した結果、Guinier 解析により、慣性半径は 2.5 mM Ca^{2+}存在下で 2.1 nm となり、最も大きかった。以上の結果より、Cut190*は 2.5 mM Ca^{2+}存在下において、最も基質と結合しやすい構造をとることが考えられ、Cut190*の活性の結果とも一致する。

PET-hydrolyzing cutinase, Ca^{2+} binding, structural dynamics

講演番号：3A08a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A08 会場

I 型アラビノガラクタンに作用するβ-ガラクトシダーゼの基質特異性について

Substrares specificity of ß-galactosidase acting on type I arabinogalactan

○近藤 辰哉[1]、松山 佳織[2]、西村 勇一[1]、石丸 恵[2]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]([1]大阪府大院・生命環境、[2]近畿大院・生物理工)
○Tatsuya KONDO[1], Kaori MATSUYAMA[2], Yuichi NISHIMURA[1], Megumi ISHIMARU[2], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Osaka Pref Univ, [2]Kindai Univ)

【背景・目的】

植物細胞壁は，骨格であるセルロース，それらを架橋するヘミセルロースおよび隙間を埋めるペクチンから構成されている．その中でもペクチンはゲル化剤や増粘剤等として使用される有用多糖であるが，その糖鎖構造は非常に複雑であり，未だ不明な点が多いのが現状である．

I 型アラビノガラクタン （AG-I） は，ペクチン主鎖中に存在するラムノガラクツロナン （RG)にグリコシド結合により直接結合している． RG 分解酵素は RG 領域の糖鎖構造解析への利用が期待されるが，本酵素群は AG-I の立体障害により活性が阻害されることから，RG の構造解析において，AG-I を選択的に分解できる酵素は非常に重要なツールとなる．

本研究では Glycoside Hydrolase （GH） family 35 に属するβ-ガラクトシダーゼ （BGAL)に着目し，ペクチン高分解菌 *Peniccillim chysogenum* 31B 株が保有する 3 種の GH35 に属する BGAL 遺伝子（PcBGAL35A, 35B, 35C）を獲得し，それらの組換えタンパク質を用いて，詳細な基質特異性解析を行った．さらに，本研究の結果から新規な基質特異性を有することが明らかとなった PcBGAL35A について，その基質特異性を X 線結晶構造解析により分子レベルで明らかにすることを目的とした．

【方法】

まず，種々のペクチン由来多糖を出発基質として，異なる結合様式を持つ様々なβ-ガラクトシルオリゴ糖を調製し，基質特異性解析に用いた．3 種の組換えタンパク質はメタノール資化酵母である *Pichia pastoris* を宿主として発現させ，精製後の標品を実験に使用した．酵素活性は遊離されるガラクトース （Gal） 量を糖分析用イオン交換クロマトグラフィーにより測定した．

【結果】

反応速度論的解析により，PcBGAL35A はβ-ガラクトオリゴ糖よりも RG 側鎖の Gal を有意に分解することができる新規な特異性を有する酵素であることが明らかとなった．PcBGAL35B はβ-ガラクトオリゴ糖およびラクトースにのみ高活性を示したことから，一般的な BGAL であった．PcBGAL35C はβ-1,4 結合を持つオリゴ糖および多糖に活性を示したことから，本酵素は BGAL 活性に加えてエキソ-β-1,4-ガラクタナーゼ活性を有することが明らかとなった．

さらに，PcBGAL35A の結晶化条件を探索した結果，PEG を骨格とする条件において，直径が約 50μm の単結晶を得ることに成功したため，大型放射光施設にて X 線回折実験を行っている段階である．

Pectin, Type I arabinogalactan, ß-galactosidase

発表責任者：近藤　辰哉（kondo.t1203@gmail.com）

講演番号：3A08a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A08 会場

芳香族化合物前駆体の高発酵生産へ向けた 2-deoxy-*scyllo*-inososse 合成酵素の改良
Improvement of 2-deoxy-*scyllo*-inososse synthase for high fermentation production of precursor for aromatic compound

○鈴木 涼子[1]、大内 秀樹[2]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、宮澤 大輔[3]、和田 光史[3]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大、[2]新潟 BRP、[3]三井化学)
○Ryoko SUZUKI[1], Hideki OUTHI[2], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Daisuke MIYAZAWA[3], Mitsuhumi WADA[3], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Niigata Bio-Research Park Inc., [3]Mitsui Chemical Inc.)

【目的】現在、化学製品は主として石油などの化石資源から生産され、我々の生活を支えている。しかし、その生産法は地球温暖化や化石資源の枯渇などの問題を抱える。この問題の解決策として、これまでのオイルリファイナリーからバイオマスを原料として製品を製造するバイオリファイナリーへのパラダイムシフトが望まれている。本研究室では、カテコール、ハイドロキノンなどの 2 価フェノールに簡単に化学合成変換可能な有用化学工業原料前駆体 2-デオキシ-シロ-イノソース(DOI)を、グルコース代謝工学的改変を施した大腸菌に DOI 合成酵素 (DOIS)をコードする *btrC* 遺伝子を導入することで、グルコースからほぼ 100%の効率で発酵生産できる組換え大腸菌を開発した。DOI はグルコース-6-リン酸 (G6P)を基質として、DOIS、補酵素 NAD^+存在下で合成される。産業利用を視野に入れると、①グルコースから DOI の変換効率、②DOI 発酵生産速度が課題であるが、前者の課題は代謝工学的改変をした大腸菌利用で克服できた。後者については、DOIS 活性が律速段階であると考えられたため、DOIS の X 線結晶構造解析結果を考慮し、DOIS にアミノ酸置換の変異を導入することで、高活性型 DOIS を取得することを試みた。その結果、319 番目のヒスチジン残基のアルギニン残基又はリシン残基へのアミノ酸置換 (H319R, H319K)が、DOI 生産性の向上に寄与することをこれまでに報告してきた。本大会では、319 番目のアミノ酸置換による DOI 生産性向上の起因について、酵素の反応速度論的解析により検討した結果に加え、H319R の DOI 生産性をさらに向上させた H319R/W293R の相乗効果についても報告する。

【方法および結果】DOI 発酵生産宿主である代謝工学的改変をした大腸菌に野生型 DOIS, H319R, H319R/W293R をコードする遺伝子を導入し、DOI 発酵生産試験を実施したところ、野生型と比較して、H319R は約 1.3 倍の DOI 生産性の向上、H319R/W293R は約 1.5 倍の DOI 生産性の向上を示した。続いて、野生型 DOIS, H319R, H319R/W293R を精製し、酵素の速度論的解析を行ったところ、野生型と比較して、H319R, H319R/W293 の双方とも G6P に対する Km が小さくなり、基質親和性が向上していた。また、kcat については、野生型と比較して H319R は小さくなり、H319R/W293R はほとんど変わらなかった。また、W293R/H319R においては、野生型及び H319R と比較して、大腸菌体内における蛋白質発現量が向上している現象が確認されたため、引き続き検討を行っている。

この成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託業務の結果得られたものである。

aromatic compound, 2-deoxy-*scyllo*-inososse, Michaelis constant

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3A08a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A08 会場

キチン由来ヘテロ 2 糖により生産が誘導される Shewanella baltica のキチナーゼについて
The chitinase of Shewanella baltica induced its production by heterodisaccharide derived from chitin

○横山 昌寛[1]、平野 貴子[1,2]、池嶋 聖史[1]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Masahiro YOKOYAMA[1], Takako HIRANO[1,2], Masafumi IKEZIMA[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Tosiyuki NISIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】一般に、海洋細菌はキチナーゼを分泌してキチンから *N,N'*-diacatylchitobiose ［$(GlcNAc)_2$］を生産し、栄養として吸収する。その中で一部の Vibrio 属細菌はさらにキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD）も分泌し、$(GlcNAc)_2$ から β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine （GlcNAc-GlcN）を生産する。これまでに我々は、本ヘテロ 2 糖はこれらの Vibrio 属細菌のキチナーゼ生産誘導因子や遊走因子であることも明らかにしてきた[1, 2)]。さらに、2 種の Shewanella 属細菌が COD 遺伝子を持っており、いずれも主に GlcNAc の 2 糖に作用して GlcNAc-GlcN を生成することも明らかにした[3, 4)]。中でも *Shewanella baltica* は、2 種類のキチナーゼ遺伝子を有しているが、その一方のみが GlcNAc-GlcN により生産が誘導されることも分かり、2016 年度に本大会で報告した[5)]。本菌のもう一方のキチナーゼの発現量は少なく、タンパク質レベルでの確認は困難だった。そこで、今回は、両キチナーゼの mRNA の発現量の比較を行った。さらに GlcNAc-GlcN により生産が誘導されるキチナーゼの酵素化学的性質を調べた。

【方法・結果】GlcNAc-GlcN が添加された培地と糖無添加の培地で *S. baltica* を培養し、全 RNA の抽出を行った。そして逆転写酵素により cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。その結果、両キチナーゼの mRNA の発現はいずれの培養条件でも見られたが、GlcNAc-GlcN を添加した際には一方のキチナーゼの転写量の増加が見られた。これはタンパクレベルでの発現誘導実験の結果と一致していた。そこで、GlcNAc-GlcN により発現が調節され、確実に機能していると考えられるキチナーゼのリコンビナント体を作製し、酵素化学的性質を調べることにした。キチナーゼ遺伝子を PCR で増幅し、pET ベクターに組み込み大腸菌発現用プラスミドを作成した。本菌を培養してキチナーゼを培地中に分泌させ、複数のカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一になるまで精製した。本酵素の酵素化学的性質を調べた結果、至適 pH が pH 6、至適温度は 50℃であり、pH 5～11 の範囲で安定だった。また、50℃以上で活性は失われた。コロイダルキチン、α–キチン、β–キチンに対する活性を比較した結果、β–キチンに最も高い活性を示すことが示唆された。$(GlcNAc)_{2\sim6}$ を基質とした時の生成物を HPLC で確認した結果、最終生成物は$(GlcNAc)_2$ であり、β–アノマーがα–アノマーに比べて多く生産されていた。従って、本キチナーゼはアノマー保持型のエキソ様反応を行うと考えられる。

1) Hirano T. *et al., Glycobiology*, **19,** 1046-1053 (2009), 2) Hirano T. *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161-166 (2011), 3) Hirano T. *et al., J. Appl. Glycosci.*, **62**, 153-157 (2015), 4) Hirano T. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochemi*, **81**, 547-550 (2017), 5) 池嶋ら，日本農芸化学会 2016 年度大会 公演番号 2F195

Chitinase, induction of gene expression, enzymological propaties

発表責任者：平野　貴子（hirano.takako@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A08p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A08 会場

納豆菌を用いた液体培養法によるリン酸化ポリグルタミン酸の生産に関する研究

Regulatory phsophorylation of poly-γ-glutamic acid with phosphate salts in the culture of Bacillus subtilis(natto)

○苔庵 泰志[1]、佐合 徹[1]、梅谷 かおり[1]、丸山 裕慎[1]、岩本 博行[2]、栗田 修[1] ([1]三重工研、[2]福山大学)
○Yasushi Kokean[1], Toru Sago[1], Kaori Umetani[1], Hironori Maruyama[1], Hiroyuki Iwamoto[2], Osamu Kurita[1] ([1]Mie Pref. Ind. Res. Inst., [2]Fukuyama Univ.)

【目的】前報[1)]の中で、納豆菌の液体培養中にリン酸塩を添加するだけでポリグルタミン酸（PGA）のリン酸化誘導体が生成され、得られたその誘導体は容易に凝集体を形成することを明らかにした。本研究では、培養条件と PGA のリン酸化度との関係を明らかにし、また PGA の特性の一つである粘性に注目し、リン酸化 PGA の構造との関連性を解明することを目的とした。

【方法】納豆菌の基本培地に対して、リン酸塩の種類、リン酸塩濃度、培地ｐH、リン酸塩の培地への添加時期、さらには、リン酸塩添加後の加熱処理等の条件を変化させ、リン酸化 PGA をアルコール沈殿法により精製した。リン酸化 PGA については、NMR 測定、動的粘弾性測定、CD スペクトル測定を行い、その物理化学的特性を評価した。

【結果及び考察】使用したリン酸塩のうち、分子内に最もリン酸基を多く含むテトラポリリン酸ナトリウムが PGA 分子内に取り込まれやすいことを確認した。そして、リン酸塩の PGA 分子内への結合部位を調べたところ、α-カルボキシル基に結合していることを ^{1}H-NMR 解析により確認した。リン酸化試薬として、テトラポリリン酸ナトリウムを使用し、その添加濃度（0.1%～1.0%,W/V）の PGA のリン酸化度への影響を調べたところ、濃度に依存してリン酸化度が高まることが明らかとなった。一方で、リン酸化度が高まるにつれて、リン酸化 PGA の収量は減少した。リン酸化試薬添加後の培地ｐH に対する PGA のリン酸化度との関係について検討したところ、至適 pH は約 4.5 であることを確認した。また、リン酸塩の添加（0.5%）を培養開始後 0～48 時間について検討したところ、培養 48 時間後に添加した場合が、最も収量が高くなった。培養 48 時間後にリン酸塩を添加し、さらに加熱処理（55℃又は 80℃）した場合、リン酸化度の高い PGA を精製できることが明らかとなった。

これら各種得られたリン酸化 PGA について、粘度を測定したところ、未処理 PGA に比べて 0.015～15 倍の粘度を有するものができることを確認し、粘度とリン酸化度との間に密接な関係があることが明らかとなった。また、CD スペクトル及び ATR-FTIR などの分析から、リン酸化度に応じたタンパク質の二次構造をとり、あるリン酸化 PGA ではコラーゲン様の立体構造をとるものも検出した。

1)Kurita et. al., Int. J. Biol. Macromol. 103, 484-492 (2017).

Bacillus subtilis, poly-γ-glutamic acid, phosphorylation

発表責任者：苔庵泰志（kokeay00@pref.mie.jp）

講演番号：3A08p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A08 会場

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* ZH-2 株のアミノ酸変換酵素に関する研究
Characteristics of amino acid racemase in *Lactobacillus sakei* ZH-2
○松本 菜月[1]、戦 思とう[2]、浅見 恭子[1]、金内 誠[1] ([1]宮城大学大学院、[2]東北大学大学院)
○Natsuki Matsumoto[1], Sitong Zhan[2], Kyoko Asami[1], Makoto Kanauchi[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Tohoku Univ.)

【背景及び目的】アミノ酸は、生物の生命体を構成する重要成分である。L 体と光学異性体の D 体が存在するが、タンパク質を構成するすべてのアミノ酸は L 体のため、これまでのアミノ酸の研究対象は L 体が中心であった。近年では、分離技術の発達により D-アミノ酸の存在と生体内での機能性が報告されている。そのため、食品中からも D-アミノ酸の検出が確認されており、特に発酵食品は生鮮食品よりも多く含まれていることが報告されている。発酵食品中の D-アミノ酸は乳酸菌中のアミノ酸ラセマーゼが L-アミノ酸を基質として変換することにより生成される。このアミノ酸ラセマーゼを利用することにより、D-アミノ酸強化食品の開発を可能にできると考えられる。一方で、アミノ酸ラセマーゼの酵素学的特性は菌株ごとに異なることが報告されている。そこで、本研究ではアミノ酸高生産乳酸菌 *Lactbacillus sakei* ZH-2 を選抜し、アミノ酸ラセマーゼの特性を酵素学的及び分子生物学的に解析することを目的とした。
【実験方法】アミノ酸高生産乳酸菌を選抜するため、食品中より 128 株の乳酸菌を分離した。これらの培養液をニンヒドリン試薬により、遊離アミノ態窒素量を測定した。アミノ酸を高生産する培地組成及び培養温度条件の検討を行った。16SrDNA のシークエンス解析により菌株を同定した。アラニンラセマーゼ活性は、酵素法及び HPLC により分析を行った。酵素法は、L-アラニンを D-アミノ酸オキシダーゼ、NADH、乳酸脱水素酵素を含む混合液と反応させ、ZH-2 株の粗酵素液を添加後、生成する D-アラニンを経時的に測定した。HPLC 分析は、キラルカラム CROWNPAK CR(+)を用い、流速 0.2ml/min で分析した。アラニンラセマーゼ遺伝子(*alr*)のクローニングは、TA-Cloning 法によった。
【結果】遊離アミノ態窒素量の高い 4 株を選抜した。これら 4 株は、0.3mg/L のパントテン酸カルシウムを含む GYP 培地においてアミノ酸生産量が増加した。最もアミノ酸生産量が高い ZH-2 株は *Lactobacillus sakei* であった。変換された D-アラニンを酵素法において経時的に測定したところ、濃度依存的に A_{340} の減少が見られ定量できることが明らかとなった。更に HPLC 分析により得られたピーク面積は D-アラニン標準品濃度と高い相関を示した。D-アラニンの生成量が酵素法での生成した量と一致したことが明らかとなった。この ZH-2 株の粗酵素液によるアラニンの変換率は、54.5%であった。また、TA-Cloning 法によりプラスミド pMD20-*alr* を得ることができた。本プラスミドを導入した *E.coli*DH5α は高いアラニンラセマーゼ活性をもつことが確認された。このことにより、pMD20-*alr* は形質転換体で発現していることが明らかとなった。

D-Amino acid, Amino acid racemase, Lactic acid bacteria

講演番号：3A08p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A08 会場

好熱性菌 *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 株由来新規セルラーゼの探索
Exploration of new cellulases from *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1
○丸岡 真由美、七谷 圭、横田 明、阿部 直樹、矢部 修平、阿部 敬悦（東北大院農）
○Mayumi MARUOKA, Kei NANATANI, Akira YOKOTA, Naoki ABE, Syuhei YABE, Keietsu ABE (Grad. sch. Agric, Tohoku Univ.)

【背景・目的】
クテドノバクテリア綱は *Chloroflexi* 門に属する既報種が僅か 7 種の未知の分類群である。これらは共通して放線菌と形状が似ており、セルロースやキシランなどの繊維質に対して分解能を有する。中でもコンポスト処理施設から発見された好熱性菌 *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 株は、細菌による分解が難しいとされる微結晶性セルラーゼに対して高い分解活性を持つことがわかっているが、本綱由来セルラーゼの諸性質に関する報告は皆無である。そこで本研究では演者らが解読した SK20-1 株のゲノム情報からセルラーゼ遺伝子を探索し、それらを大腸菌にて発現させて諸性質を解明することを目的とした。
【方法・結果及び考察】
SK20-1 株のゲノム情報を用いて糖質加水分解酵素ファミリー（GH）と推定される遺伝子を検索した結果、33 種、68 個も見いだされた。これらの中にはエキソ型セルラーゼと推定される GH6（非還元末端から切断）、GH48（還元末端から切断）、およびエンド型セルラーゼと推定される GH5、9、12 が含まれ、これらが自然界のセルロース系バイオマスの分解に複合的に関与していることが強く示唆された。それらの推定セルラーゼ（GH5、6、9、12、48）の C 末端に TEV プロテアーゼ認識配列と His-tag を付加した状態の遺伝子を pET22b ベクターに組み込み、*E.coli* C43 rosetta 株を形質転換した。各発現株を 0.5%の微結晶性セルロースおよび CMC を含むプレートに接種して培養したところ、GH5、9、12 発現株は CMC プレートにおいて明確なハローが確認されたため、少なくともこれらはセルラーゼ（β-1,4-グルカナーゼ）であることが判明した。一方、微結晶性セルロースプレートにおいてハローは認められなかった。次に GH5、9、12 遺伝子を分子系統解析したところ、GH5 と GH9 はそれぞれ好熱性放線菌の一種である *Acidothermus cellulolyticus*、*Thermobifida fusca* 由来の GH5 及び 9 と近縁であった。一方、GH12 は近縁の既知酵素がなくバクテリアと真核生物の中間に位置する極めて新規性の高いセルラーゼであることが判明した。更に GH12 の酵素学的諸性質を解明するため、GH12 発現株の菌体破砕液から TALON アフィニティーカラムを用いて His-Tag 精製を行った。得られた粗酵素液を TEV プロテアーゼで処理し、His-Tag を切断した。精製酵素を用いて至適反応温度、pH を測定したところ、70℃、pH5~6 と高温条件下でも高い活性を示す新奇酵素であることが明らかとなった。現在その他の諸性質についての解析を進めている。

Thermosporothrix, cellulase, compost

講演番号：3A08p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A08 会場

浸漬ワクチンの開発に向けた魚病細菌の外膜タンパク質の精製とその抗原性の評価
Purification of outer membrane protein of fish-disease bacteria for development of immersion vaccine and evaluation of its antigenicity

○三留 規誉[1]、山下 真泉[1]、篠原 悠[1]、濱田 凪朝[1]、スン エン　カーン[2] ([1]宇部高専、[2]ナンヤンポリテクニック)
○Noriyo Mitome[1], Naoki Yamashita[1], Yu Shinohara[1], Nagisa Hamada[1], Eng Khuan Seng[2] ([1]NIT Ube College, [2]Nanyang Poly.)

【背景・目的】　水産用のワクチンには注射法ワクチン、経口法ワクチン、浸漬法ワクチンがある。これまでの研究開発は、注射法ワクチンの研究が中心に行われており、ワクチンの開発研究は、病原性微生物をホルマリンで不活化させたワクチンの有効性の試験、連続注射器の開発が中心で他のワクチンの開発は遅れている。浸漬法ワクチンは、簡便で実用性が高いがこれまでに実用化されているものは、アユ・サケのビブリオ病に対するワクチンに限られている。浸漬ワクチンでは、ワクチンを運搬する適切なベクターの開発とワクチンとなる抗原性タンパク質の精製法の確立が必要である。また、実用的なワクチンの開発には、迅速で安価で、容易にスケールアップが可能な抗原性タンパク質精製法の確立が求められる。この研究では、キトサンを原料とした新規ナノ材料であるナノチューブを利用して細菌性の魚の病気に適用可能な実用的な水産用ワクチンを開発する。そのために、①ワクチンのベクターとなるナノチューブを作製する。②ナノワクチンの作製に必要な抗原性タンパク質の精製法を確立するとともに抗原抗体反応により抗原性を確認する。③抗原性をもつタンパク質をナノ粒子に導入する方法を確立する。④抗原性タンパク質を導入したナノ粒子（ナノワクチン）を魚に接種させ、ワクチンの効果を評価する。

【方法・結果】　細菌性魚病の原因菌である *Tenacibaculum maritimum*、海洋性 *Viblio* 22B、*Edwardsiella tarda* を微生物用の培地で培養し、遠心分離によって微生物の菌体を得た。次に、コイ（体長 10cm 約 15g）の体内にホルマリンで不活性化した微生物（100μg）を注射法により接種させ、3 週間水槽で飼育した後、飼育したコイから血液を 200μl 採取し、抗体を含む血清として用いた。この血清が微生物に結合することをドットブロッティングで確認した。

抗原性外膜タンパク質を精製するために、各微生物を超音波処理することより、細胞膜を破砕する。遠心分離法と超遠心分離法により、破砕した細胞液から、膜画分（外膜画分と内膜画分）と細胞質画分を分離する。膜画分から界面活性剤であるトリトン X-100 を含む緩衝液により、内膜タンパク質の多くを可溶化して、超遠心分離法により、可溶性画分と沈澱物に分けた。可溶性画分は主に内膜タンパク質が、沈殿物には、主に外膜タンパク質が含まれる。沈殿物をさらに界面活性剤で処理することにより、外膜タンパク質を抽出した。界面活性剤による抽出法で精製したタンパク質について、抗原性をもつかどうかを微生物のタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで確認した。今後、ナノチューブに抗原性外膜タンパク質を導入したナノワクチンの有効性を評価する。

vaccine, outer membrane protein, antigenicity

発表責任者：三留規誉（nmitome@ube-k.ac.jp）

講演番号：3A08p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A08 会場

Characterization and analysis of domain-function relationship in thermostable endolysin from template bacteriophage φOH2

○Mina Kim[1], Mayu Hirose[2], Martono Hindra[1], Yuko Nagayoshi[1], Toshihisa Oshima[3], Yasuhiro Fujino[1,2], Katsumi Doi[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosc. Biotech., Kyushu Univ., [2]Fac. Agr., Kyushu Univ., [3]Fac. Eng., OIT)

Introduction A bacteriophage (phage) is a virus that infects bacteria and induces host bacterial cell lysis to emit its progeny to outside the cell. This host lysis is mainly caused by phage's lytic enzyme, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, which cleaves cell wall peptidoglycan of bacteria. As a result, the host bacterium is destroyed. Therefore, endolysin is being considered as a potential alternative to antibacterial agents against increasing problems of multi-drug resistant bacteria. In our previous study, It was revealed that endolysin-encoding gene (*lysOH2*) exists in thermophilic phage φOH2 genome, and LysOH2 contains two-module structures with N-terminal PGRP domain (known as an enzymatically active domain) and C-terminal LysM (known as a cell wall binding domain). In this study, LysOH2 protein was expressed, and its characterization and comparison of domain activity were investigated as a first step towards development of novel antibacterial agents.

Materials and Methods Native form and variants of *lysOH2 genes* (*lysOH2_pgrp*, *lysOH2_pgrp-linker*, *lysOH2_lysM* and *lysOH2_linker-lysM*) were amplified and cloned into the pET21 a (+) expression vector. Recombinant proteins were over-expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) by IPTG induction, and were purified using a Ni-NTA resin with an imidazole gradient. Lytic activity was evaluated on the indicator strain *Geobacillus kaustophilus* NBRC102445 by spot test and turbidity reduction assay, observing the clear zone on the bacterial lawn or measuring reduction in O.D.450 of bacterial suspension, respectively, after addition of purified native LysOH2 or separated domain parts of LysOH2 proteins.

Results and discussion Native LysOH2 showed highest lytic activity at 70°C and pH 7.0, and showed excellent thermostability up to 85°C, as well as pH stability at pH 5.0 to 10.0. Native LysOH2 exhibited the lytic activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, including pathogenic bacteria. In domain test, lytic activity and thermostability were still retained when LysM is deleted from LysOH2, but enzymatic activity was lower than its native form. Interestingly, LysM, which known as a cell wall binding domain, also showed lytic activity in spot test, but enzymatic activity was higher when LysM possesses linker. These results suggest that LysOH2 has potential for application as an novel antibacterial agent, which has remarkable thermal stability and substrate specificity.

endolysin, bacteriophage, antibacterial activity

講演番号：3A09a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A09 会場

新奇乳酸菌バクテリオシンの探索および構造解析

Screening and structural analysis of novel bacteriocins produced by lactic acid bacteria

○山城 圭輔、大橋 千紘、善藤 威史、園元 謙二 (九大院・農)
○Keisuke YAMASHIRO, Chihiro OHASHI, Takeshi ZENDO, Kenji SONOMOTO (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【背景・目的】乳酸菌が生産する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、天然の安全な抗菌物質として様々な用途への利用が期待される。その構造や性質は多様であり、多種多様な乳酸菌バクテリオシンを組み合わせて利用することで、より効果的な微生物制御の実現が期待される。そのためには、性質が異なる様々なバクテリオシンの探索と蓄積が重要となる。そこで本研究では、新奇バクテリオシンの発見を目指し、食品や土壌をはじめとする様々な分離源から、バクテリオシン生産乳酸菌の探索を行った。
【方法】野菜や花、土壌など 30 種のサンプルを分離源とし、乳酸菌が優位に生育するような条件で集積培養を行い、炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地上で乳酸菌を単離した。Direct 法や Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験により、得られた乳酸菌のバクテリオシン生産能およびその抗菌スペクトルを調べた。また、16S rRNA 遺伝子を解析し、バクテリオシン生産菌の同定を行った。さらに、特徴的な抗菌活性を示したバクテリオシンの精製、構造解析を試みた。各バクテリオシンは、疎水性相互作用クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、および逆相 HPLC の 3 段階で精製した。精製したバクテリオシンについて、分子量およびアミノ酸配列の解析を行った。得られた分子量やアミノ酸配列、抗菌スペクトル等の諸特性をもとに、既報のバクテリオシンとの比較およびデータベース検索を行うことで、その新奇性を評価した。
【結果】様々な分離源からのスクリーニングにより、計 125 株の乳酸菌を単離することができた。そのうち 24 株において、バクテリオシン様の抗菌活性物質の生産が確認された。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、特に強力な抗菌活性を示した MR4 株と FR6 株はそれぞれ *Enterococcus faecalis*、*Lactococcus garviae* と同定された。精製および分子量測定、N 末端アミノ酸配列解析の結果、MR4 株が生産するバクテリオシンは、*E. faecalis* のいくつかの株のゲノムにコードされている機能未知の推定タンパク質と高い相同性を示した。また、FR6 株は 2 種の異なるバクテリオシンを生産することが明らかとなった。現在、これらのバクテリオシンについて、より詳細な解析を行っている。

bacteriocin, lactic acid bacteria, antimicrobial peptide

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A09a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A09 会場

乳酸菌由来の環状抗菌ペプチド、エンテロシン NKR-5-3B の生合成を担う EnkB2 の機能解析
Characterization of EnkB2 responsible for enterocin NKR-5-3B, a circular antimicrobial peptide from lactic acid bacteria

○佐戸 翔太[1]、池田 史織[1]、高城 博也[1]、杉野 春貴[1]、PEREZ Rodney H.[1,2]、石橋 直樹[1]、善藤 威史[1]、園元 謙二[1] ([1]九大院・農、[2]フィリピン大・ロスバニョス校)
○Shota SADO[1], Shiori IKEDA[1], Hiroya TAKI[1], Haruki SUGINO[1], Rodney H. PEREZ[1,2], Naoki ISHIBASHI[1], Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]BIOTECH, Univ. the Philippines Los Banos)

【背景・目的】近年、乳酸菌が生産する安全な抗菌性ペプチドのバクテリオシンに注目が集まっている。特にペプチドの N 末端と C 末端が共有結合した環状バクテリオシンは、耐熱性・耐酸性に優れており、食品保存料や医薬品への利用のみならず、新奇ペプチドの創出に向けたその環状化機構の利用も期待されている。環状バクテリオシンの生合成には、リーダー配列の切断、環状化、分泌のプロセスが必要であることが知られているが、その詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産する環状バクテリオシン、エンテロシン NKR-5-3B（Ent53B）の環状化機構の解明を目的とし、生合成タンパク質の機能解析を行った。
【方法】先行研究によって、Ent53B の最小生合成遺伝子群（*enkB*、*B1*～*B4*）が特定された。このうち、*enkB2* は DUF95 スーパーファミリータンパク質（DUF95）をコードする遺伝子に相同性を示す。DUF95 の機能は未知であるが、環状バクテリオシン生産菌に共通してみられるため、環状化への関与が予想される。EnkB2 の機能解析を行うため、EnkB2 のアミノ酸のうち、DUF95 で特に保存性の高いアミノ酸残基をアラニンや構造が類似したアミノ酸に置換した変異株を構築した。構築した変異株について、抗菌活性試験によりバクテリオシンの生産分泌能を評価した。このうち、生産分泌が確認できなかった変異株は、菌体内に Ent53B やその前駆体の蓄積が予想されたため、菌体内画分の抗菌活性も評価した。また、変異株の生育挙動をモニターし、宿主の生育に与える影響を評価した。さらに、変異導入が EnkB2 の構造に与える影響を調査するため、膜貫通領域や回数の推定を行った。
【結果および考察】バクテリオシン分泌生産能の評価の結果、DUF95 で保存されている各アミノ酸残基を置換した全ての変異株で、抗菌活性の消失や著しい減少が確認された。その一方で、保存されていない各アミノ酸残基を置換した変異株では抗菌活性の低下が認められなかった。また、変異株の菌体内画分からは Ent53B やその前駆体は確認されず、誘導期の延長が見られたものの、各変異株には大きな生育抑制は確認されなかった。さらに、置換部位にかかわらず、全ての変異株において変異導入による膜貫通領域や回数の変化はほとんど確認されなかった。これらの結果から、EnkB2 のうち、DUF95 で保存されているアミノ酸が機能的に必須であることが示唆された。現在、EnkB2 の機能に必須であるアミノ酸の特性を調査するため、疎水度、電荷、ヘリックス形成能の観点からさらに様々なアミノ酸に置換した変異株の構築を行い、同様の評価を行っている。

bacteriocin, lactic acid bacteria, circular peptide

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A09a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A09 会場

熊本県環境中から分離した抗菌性乳酸菌の同定とそれらが生産するバクテリオシンの精製 および特性

Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from the environment in Kumamoto prefecture, and purification and characterization of their bacteriocins

○八浪 早季[1]、山下 奈菜[2]、善藤 威史[3]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]九大院・農)
○Saki Yatsunami[1], Nana Yamashita[2], Takeshi Zendo[3], Hiromi Matsusaki[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】乳酸菌が生産するバクテリオシンは、安全な食品保存料としての利用が期待されている。本研究では、新たな特徴をもつ新規バクテリオシンを探索することを目的として、熊本県環境中からバクテリオシンを生産する抗菌性乳酸菌を分離し、それらの菌株の同定と生産されるバクテリオシンの特性を調べた。

【方法および結果】熊本県環境中から分離された抗菌性乳酸菌について、16S rRNA 遺伝子解析および糖類資化性試験、さらには *Leuconostoc* 属の種特異的プライマーを用いたゲノム DNA の PCR を行い、ダイコン由来分離菌を *Enterococcus* sp. PUK2、土壌由来分離菌 2 株を *Leuconostoc lactis* PUK4 および PUK5 と同定・命名した。また、5%ヒツジ血液含有コロンビア寒天培地を用いて溶血性を調べたところ、PUK2 株は溶血性を示さなかった。次に、PUK2 株が生産するバクテリオシンの特性について調べた。PUK2 株が生産するバクテリオシンは、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lb. plantarum* ATCC14917^T, *Enterococcus faecalis* に対して抗菌活性を示し、耐熱性試験において 100˚C、30 分の加熱でもその活性が保持された。また、既報の enterocin (enterocin A, B, P, L50A, L50B, AS48 および cytolysin) の構造遺伝子に特異的なプライマーを用いたゲノム DNA の PCR を行ったところ、いずれも特異的増幅は見られなかった。そこで PUK2 株バクテリオシンの精製法を検討した。PUK2 株を MRS 液体培地にて 37˚C 、9 時間培養した培養液上清について、硫安沈殿分画（70%飽和）、透析（MWCO 1,000）を行い、逆相系前処理カラム Sep-Pak tC$_{18}$ を用いて精製・濃縮したところ、アセトニトリル濃度 50%の溶出画分で抗菌活性がみられたため、この画分について逆相 HPLC を行った。現在、PUK2 株が生産するバクテリオシンのさらなる精製を進めている。

bacteriocin, lactic acid bacteria, *Enterococcus*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A09a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A09 会場

味噌漬け豆腐から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* PUK6 における多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の塩基配列決定

Determination of the nucleotide sequence of the multiple bacteriocins biosynthesis-related gene cluster in *Lactobacillus plantarum* PUK6 isolated from *Tofu* pickled in *Miso*

○河原 あい[1]、山下 奈菜[2]、善藤 威史[3]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院、[2]熊本県大、[3]九大院)
○Ai KAWAHARA[1], Nana YAMASHITA[2], Takeshi ZENDO[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】乳酸菌が生産するタンパク質性増殖阻害物質であるバクテリオシンは、その安全性の高さから天然の食品保存料として期待されている。本研究では、熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの精製と遺伝子クローニングを行うことを目的とした。

【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清について、70%飽和硫安分画、透析（MWCO 1,000）、逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製した。HPLC で得られた Fraction 1~7 について *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T を用いたバイオアッセイの結果、Fraction 1 および 4 で抗菌活性がみられた。Fraction 4 のアミノ酸配列分析の結果、既知のバクテリオシンと相同性を示さず、新規バクテリオシンあるいは機能不明タンパク質の分解物である可能性が示唆された。Fraction 1 については、HPLC による精製をさらに進めたところ、新たに 8 つのピークが得られ、全てに抗菌活性が検出された。抗菌活性が高かった３つのピークのアミノ酸配列を調べた結果、plantaricin A, NC8β および F と相同性を示した。これらバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物の塩基配列を決定した。その結果、plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出した。さらに、PCR を行い、PUK6 株の各バクテリオシン構造遺伝子は、*plnNC8*、*plnA* および *plnFE*（逆向き）の並びで位置していることが明らかとなった。これらの遺伝子の位置や BLAST 検索の結果から、PUK6 株の多成分バクテリオシンの構造遺伝子および生合成関連遺伝子は、これまでに報告されている *L. plantarum* 8P-A3 株および J51 株の *pln* locus と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた [1)]。そこで、その情報を参考にプライマーを設計し、ゲノム walking を行い、PUK6 株の plantaricin 遺伝子群 *pln* locus（約 17 kb）の全塩基配列を決定した。現在、各遺伝子の機能解析を進めている。

1) Tsapieva, A. *et al*., *Benef. Microbes*, **2**, 255-261 (2011)

bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A09a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A09 会場

プロピオン酸菌が生産する抗菌タンパク質の探索と精製
Screening and purification of antimicrobial protein produced by propionic acid bacteria
○高屋 朋彰、金子 兼大、栗原 瑛人、中久喜 真理、檜佐 武（小山高専・物質）
○Tomoaki Kouya, Tomohiro Kaneko, Eito Kurihara, Mari Nakakuki, Takeru Hisa (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】
乳製品由来プロピオン酸菌（*Acidipropionibacterium* 属など）が生産する抗菌タンパク質は，近縁の微生物をはじめとして，多くの微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている．
本研究では、尋常性ざ瘡（ニキビ）や日和見感染症，難病（サルコイドーシス）の一因であるニキビ菌（*Cutibacterium acnes*）に対して抗菌作用を示す，乳製品由来プロピオン酸菌のスクリーニングおよび新規な抗菌タンパク質の分離・精製を目的とした．
【方法】
検定菌として乳製品由来プロピオン酸菌（*Acidipropionibacterium thoenii* JCM 6435 など，理化学研究所バイオリソースセンターより分譲)，被検菌として皮膚疾患菌（*Cutibacterium acnes* JCM 6473 など）を用いた．抗菌物質生産菌のスクリーニングは，抗菌活性試験（Agar spot 法または Disk diffusion 法）を用いて評価した．
液体培地を用いて嫌気培養した *A. thoenii* JCM 6435 の培養液を遠心分離し，培養上清を回収した．硫酸アンモニウムを 80%飽和となるようにして硫安沈殿を行った後，遠心分離によって回収したタンパク質を再溶解してから透析膜（MWCO 1,000）を用いて脱塩し，凍結乾燥を行った．得られた凍結乾燥粉末を再溶解させ，分子量分画や陰イオン交換クロマトグラフィー（HiTrap Q FF、1ml（GE ヘルスケア社)）を行った．得られた各画分を脱塩，凍結乾燥した後，電気泳動（SDS-PAGE）による分子量分布の評価や抗菌活性試験による抗菌性評価を行った．
【結果】
Agar spot 法により， *A. thoenii* JCM 6435 などのコロニー周囲に被検菌（*C. acnes* JCM 6473）に対する増殖阻止円が観察された．次に *A. thoenii* JCM 6435 の培養上清に含まれるタンパク質成分を濃縮・脱塩し，Disk diffusion 法による抗菌活性評価を行った．その結果， 80%硫安沈殿画分の抗菌性を確認できた．得られた抗菌タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画したところ，特定の吸着画分が強い抗菌活性を示した．現在，分子量分画や SDS-PAGE を用いて，*A. thoenii* JCM 6435 が生産する抗菌タンパク質の特定を進めている．

propionic acid bacteria, *Acidipropionibacterium*, antimicrobial protein

講演番号：3A09a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A09 会場

新規ラッソペプチド brevunsin の異宿主生産
Heterologous production of a new lasso peptide brevunsin
○小谷 真也[1]、三宅 湧登[1]、中川 博之[2] ([1]静大農、[2]農研機構・高度解析セ)
○Shinya Kodani[1], Yuto Miyake[1], Hiroyuki Nakagawa[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]NARO)

ラッソペプチドは N 末端にマクロラクタム環を有しており、C 末端ペプチド鎖が環に貫通して投げ縄構造を形成しているペプチドである。その生合成遺伝子は、生合成遺伝子クラスターを形成しており、3000－5000 bp であり PCR で十分に増幅可能な長さである。通常の培養条件ではラッソペプチドは生産されることが少なく、ゲノムマイニングで発見されたラッソペプチド生合成遺伝子クラスターは、大腸菌を用いた異宿主生産が行われている。最近の研究で、発表者は *Sphingomonas subterranea* NBRC 16086 がラッソペプチドを通常の培養条件で大量に生産することを見出している[1]。一方で、以前の研究で、*Sphingomonas* 属においてプラスミドが保持されるために必要な領域である repA 及び par 領域が特定されており、シャトルベクターが構築されている[2]。そこで本研究において、*Sphingomonas* 属細菌でのラッソペプチドの発現生産を目的として、既報に従い repA 及び par 領域をプラスミドに組み込みシャトルベクターを構築した。さらにそのシャトルベクターを用いてゲノムマイニングにより見出した新規ラッソペプチド brevunsin の異宿主生産を *S. subterranea* を宿主に用い行った。

まず、*Sphingomonas yanoikuyae* NBRC 15102 のプラスミド pYAN-1 から repA 及び par 領域を PCR 法で増幅後、別の大腸菌用クローニングベクターpHSG396 へ組み込んだ。これを用いて *Escherichia coli* DH5 α を形質転換しシャトルベクターpHSG396Sp を得た。次にゲノムマイニングで見出した *Brevundimonas diminuta* NBRC12697 の新規ラッソペプチド brevunsin の遺伝子クラスターを PCR で増幅し、当該遺伝子領域を pHSG396Sp に組み込みラッソペプチド発現ベクターpHSG396sp-12697L を得た。pHSG396sp-12697L をエレクトロポレーションで *S. subterranea* NBRC16086 に導入し後、MBM 液体培地で培養し、培養物をメタノールで抽出を行った。得られた抽出液を HPLC と質量分析装置を用いて分析を行ったところ、pHSG396sp-12697L を有した *S. subterranea* が予想されるラッソペプチド brevunsin を生産していることを確認した。以上のようにゲノムマイニングによって新規ラッソペプチド生合成遺伝子クラスターの DNA 配列を見いだし、新たに構築したシャトルベクターを用いて *Sphingomonas* 属細菌での発現に成功した。

[1] Kuroha et al.Tetrahedron Letters, 2017, 58(35), 3429-3432,
[2] Hayashi & Kurusu, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(3), 510-515

lasso peptide, heterologous production, mass spectrometry

発表責任者：小谷真也（kodani.shinya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A09a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A09 会場

組換え大腸菌の代謝改変による 4-アミノフェニルアラニンの発酵生産

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved 4-aminophenylalanine production

○川口 秀夫[1]、若井 桂子[1]、桝尾 俊介[2]、高谷 直樹[2]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院イノベ、[2]筑波大生命環境科学)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Keiko WAKAI[1], Shunsuke MASUO[2], Naoki TAKAYA[2], Akihiko KONDO[1]
([1]Kobe Univ., [2]Univ. Tsukuba)

【背景と目的】芳香族ポリマーであるポリベンゾイミダゾール（PBI）は、プラスチックの中で、最も高い耐熱性と力学的強度を示す高性能なスーパーエンジニアリングプラスチックの代表であり、ガラス代替素材など多様な用途展開が期待されている。4-アミノ桂皮は（4ACA）を原料とする PBI は、ポリカーボネートの 6 倍に相当する高い力学強度（>400 MPa）と高い透明度を示し、石油代替となるバイオエンプラとして注目されている。4ACA の生物的生産についてはこれまでに、組換え微生物によるグルコースからの 4 アミノフェニルアラニン（4APhe）発酵と、4APhe バイオコンバージョン（脱アミノ化）を組み合わせた、２段階プロセスが報告されている。本研究では、この第 1 ステップである 4APhe 発酵の収率向上を目的に、組換え大腸菌の代謝改変を行なった。

【結果と考察】フェニルアラニン高生産大腸菌 NST37 を宿主に、*Pseudomonas fluorescens* 由来 4-amino-4-deoxychorismate synthase（*papABC*）を高発現させた 4APhe 生産株を作製した。作製した組換え菌を用いてグルコースを炭素源とする発酵産物を測定した結果、目的化合物である 4APhe の他に、酢酸・乳酸などの有機酸が蓄積が認していた。これらの副生物の生成を抑制するため、宿主の酢酸生合成経路と乳酸生合成経路の代謝酵素をコードする遺伝子の破壊株を作成した。その結果、酢酸と乳酸の生合成をほぼ完全に抑制することができた。作成した破壊株をベースに 4APhe 生産株を再構築し、グルコースからの発酵生産を評価した。その結果、親株で認められた 3.5 g/L の酢酸蓄積はほぼ消失し、4APhe が 2.3 g/L の生産性で得られた。さらに、4APhe 生合成シキミ酸経路を増強するために解糖系の代謝改変も実施したので、この結果等についても併せて報告する。

【謝辞】本研究は科学技術振興機構(JST)による先端的低炭素化技術開発(ALCA)の助成を受けて実施した。

Escherichia coli, Metabolic engineering, 4-Aminophenylalanine

発表責任者：川口　秀夫（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A09a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A09 会場

システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産

Fermentative overproduction of ergothioneine in cysteine-producing *Escherichia coli*

○河野 祐介[1]、田中 尚志[1]、城山 真恵加[1]、大城 聡[1]、佐藤 康治[2]、大利 徹[2]、大津 厳生[1]([1]筑波大・高細精医、[2]北大院・工)
○Yusuke Kawano[1], Naoyuki Tanaka[1], Maeka Shiroyama[1], Satoshi Oshiro[1], Yasuharu Satoh[2], Tohru Dairi[2], Iwao Ohtsu[1] ([1]Innov. Med. Res. Inst., Univ. of Tsukuba, [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【背景･目的】

エルゴチオネイン（ERG）は、含硫黄アミノ酸の一種であり、高い抗酸化能を有する機能性分子として、近年、産学界の注目を集めている。その生合成は、一部のバクテリアやキノコ類で行われているが、ヒトや植物はその生合成系を有していない。しかしながら、ヒトは、食事から ERG を摂取・吸収し、これを自身の細胞・生体の健全な活動維持に重要な「抗酸化システム」として有効活用している。このような ERG の有用性の一方で、その安価な生産法については、未だ発展途上の段階にあり、現状では非常に高価であるという課題が残されている。よって、本研究では、ERG 生合成能はないが遺伝子工学的基盤が整っている大腸菌を用いて、合成生物学および代謝工学的なアプローチにより、発酵生産による安価な ERG 高生産系を確立することを目的とした。

【結果･考察】

ERG の高生産には、分子骨格となるヒスチジン、そのアミノ基のトリメチル化に要する *S*-アデノシルメチオニン、そのイミダゾール環へのチオン基導入に要するγ-グルタミルシステイン（システインとグルタミン酸から生成）の供給強化が鍵となる。各反応の触媒酵素は、*Mycobacterium* 属細菌で生合成遺伝子クラスター（*egtABCDE*）にコードされていることが知られている。我々は、これらの遺伝子群を、オペロン型として、IPTG で誘導可能な発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入することで ERG の合成生物学的な発酵生産を実現した。更なる ERG 生産性の改善のためには、（１）γ-グルタミルシステイン供給能の強化の目的では、その基質となるシステイン生合成の強化育種を行った。また、（２）*S*-アデノシルメチオニンの供給能の強化の目的では、葉酸回路およびメチオニン生合成系の遺伝子群の発現を負に一括制御している転写因子遺伝子の破壊育種も実施した。また、上記の基質類の添加等の培地成分の条件検討も行い ERG 生産への効果を検証した。最終的には、ジャーファーメンターを用いた発酵生産培養系を適用することにより、菌体濃度を高めつつ、基質類のフィード条件を最適化することで、1 g/L を越える ERG 生産に成功した。本発表では、当研究開発の成果について報告・議論し、更なる生産性改良を志向した育種状況・戦略についても紹介する。なお、本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（26027AB）の支援を受けて行った。

ergothioneine, cysteine, *Escherichia coli*

発表責任者：大津　厳生（ohtsu.iwao.fm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A09a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A09 会場

カロテノイド生産のためのゲノム組換え大腸菌の創出

Construction of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for biosynthesis of carotenoids

○竹村 美保、美濃部 侑香、三沢 典彦（石川県大資源研）
○Miho TAKEMURA, Yuka MINOBE, Norihiko MISAWA (Ishikawa Pref. Univ.)

＜目的＞これまでに、我々はカロテノイ生合成遺伝子をプラスミドベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換することにより、大腸菌でカロテノイドを生産する系を構築している。この方法では、形質転換大腸菌がプラスミドを落とす恐れがあり、それを防ぐために抗生物質を添加し続ける必要がある。それに対して、カロテノイド生合成遺伝子を大腸菌のゲノムに挿入することができれば、プラスミドを維持するための様々なコストを省くことができる。そこで本研究では、大腸菌のゲノムに、これまで我々が用いてきたカロテノイド生合成遺伝子を相同組み換えにより挿入することを試みた。

＜方法＞大腸菌株として、これまでに相同組み換えの報告がなされている BW25113, MG1655 の 2 つの大腸菌株を用いた。カロテノイド生合成遺伝子挿入部位については、通常の生育条件では大腸菌の生育に問題がないと考えられる *malE-F-G* 遺伝子領域あるいは *manX-Y-Z* 遺伝子領域を選んだ。カロテノイド生合成遺伝子群としては、*Haematococcus pluvialis* 由来 *idi* 遺伝子、*Pantoea ananatis* 由来 *crtE,B,I,Y,Z* 遺伝子等を用いた。まず、*malE* (*manX*) と *malG* (*manZ*) の部分配列の間に、カナマイシン耐性遺伝子とカロテノイド生合成遺伝子群を挿入したプラスミドベクターを作成した。次に、相同組み換えのための DNA 断片を PCR によって増幅し、λ Red recombinase を発現する大腸菌 BW25113, MG1655 にエレクトロポレーション法により導入、相同組み換えを誘導した。

＜結果および考察＞どれくらいの長さの断片が、相同組換えにより挿入されるかを調べるために、カロテノイド生合成遺伝子群を様々な長さで挿入したプラスミドを作成し、大腸菌に導入した。その結果、カナマイシン耐性遺伝子を含めて 4kb 以上の断片は換えが起きにくいことがわかった。また、大腸菌株の種類や挿入遺伝子領域によって、組換え頻度が大きく異なることはなかった。そこで、相同組み換えを繰り返すことにより、少しずつカロテノイド生合成遺伝子をつなげていくことにした。そのために、クロラムフェニコール耐性遺伝子とカロテノイド生合成遺伝子群を持つ相同組換え用プラスミドを作成し、先に得られたカナマイシン耐性大腸菌に対して、相同組み換えを誘導した。その結果、効率は低かったが、より長いカロテノイド生合成遺伝子を持つ大腸菌が得られた。現在、効率を上げるための方法を検討しながら、順次相同組換えを行っている。また、得られたゲノム組換え大腸菌については、挿入された遺伝子が活性を持つかどうか調べている。

carotenoid, *Escherichia coli*, genome

発表責任者：竹村美保（mtake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3A09a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A09 会場

赤色海洋酵母が産生する希少カロテノイドの生理機能解析

Analysis of biological activity of rare carotenoids derived from a red marine yeast

○海老原 健太[1]、鈴木 隆広[2]、浜本 牧子[1,2] ([1]明治大院農、[2]明治大)
○Kenta EBIHARA[1], Takahiro SUZUKI[2], Makiko HAMAMOTO[1,2] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch., [2]Meiji Univ.)

超高齢化社会になり、健康への関心が高まっている現代の日本において、薬に頼らない健康維持・増進、疾病の予防・改善に対する社会的な要請は益々強くなっている。一方、海洋酵母は新たな遺伝資源として注目されている。我々は新規機能性カロテノイドの探索を行う過程で、赤色海洋酵母 *Sporobolomyces symmetricus* が希少カロテノイド 2-Hydroxyplectaniaxanthin を産生することを見出した。本カロテノイドは、優れた一重項酸素消去作用及び脂質過酸化反応抑制作用を有するとともに、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞及びヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 A549 細胞の増殖阻害作用及びアポトーシス誘導に関与していることを見出した[1)]。本研究では本カロテノイドが関与するアポトーシス経路の解明を行った。HeLa 細胞におけるカスパーゼ活性化への影響について調べた結果、Caspase-3/7, 8, 9 の活性化がみられた。このことから、2-Hydroxyplectaniaxanthin による HeLa 細胞のアポトーシス誘導はカスパーゼを介するものであると考えられた。A549 細胞のアポトーシス誘導及びヒト表皮由来角化細胞に対する作用についても報告する。

[1)] 佐藤ら，日本農芸化学会 2015 年度大会

(本研究は海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センターとの共同研究に基づくものである)

carotenoid, red marine yeast, Sporobolomyces symmetricus

講演番号：3A09a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A09 会場

オーランチオキトリウム属キサントフィル高生産変異株の作出とメタボローム情報による生産性向上

Isolation of *Aurantiochytrium* sp. mutants and metabolome analysis for improvement of xanthophyll productivity

○渡邉 研志[1,4]、アラフィレス キム[1,4]、東 莉沙[1,4]、岡村 好子[1,4]、田島 誉久[1,4]、松村 幸彦[2,4]、中島田 豊[1,4]、松山 惠介[3]、秋 庸裕[1,4]（[1]広島大院・先端、[2]広島大院・工、[3]長瀬産業株式会社、[4]CREST, JST）
○Kenshi Watanabe[1,4], Kim Arafiles[1,4], Risa Higashi[1,4], Yoshiko Okamura[1,4], Takahisa Tajima[1,4], Yukihiko Matsumura[2,4], Yutaka Nakashimada[1,4], Keisuke Matsuyama[3], Tsunehiro Aki[1,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]NAGASE & CO, LTD., [4]CREST, JST)

【背景】当研究室では海洋性真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属が有する高い増殖性と，高度不飽和脂肪酸やキサントフィル類などの高付加価値油脂の生産能に着目し，分子育種による油脂生産性の向上や利用可能基質の拡充を通じて本微生物の産業利用の可能性を検討してきた。この内，キサントフィル類はアスタキサンチン（ASX）やカンタキサンチン（CAX）などを含む脂溶性色素であり，その高い抗酸化作用に起因する抗炎症，抗腫瘍，脂質代謝改善，皮膚老化の防止などの作用が報告されていることから，医薬品，健康食品，化粧品などの分野で需要が高い。藻類，真菌，細菌によるキサントフィル類の発酵生産が実用化及び研究されているが，生産効率や生産コストには改善の余地がある。本研究ではオーランチオキトリウム属をキサントフィル類の新たな工業生産微生物として提案すべく，突然変異誘発によるキサントフィル高生産株の作出と細胞内メタボローム情報を利用した培養条件検討によるキサントフィル生産性の向上を試みた。
【結果・考察】高増殖性のオーランチオキトリウム属 RH-7 株を 1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジンで変異処理した後に寒天培地上に塗布して培養した。生えてきたコロニーの中から色調が顕著に変化した株を単離してグルコースを炭素源とする培地で培養し，高速液体クロマトグラフィーにより各単離株のキサントフィル生産性を確認したところ，親株と比較して CAX，ASX 生産性がそれぞれ顕著に高い RH-7A 株および RH-7A-7 株を単離した。ガスクロマトグラフー飛行時間型質量分析計により RH-7A 株の細胞内メタボロームを解析して，親株のそれと比較したところ，RH-7A 株ではペントースリン酸経路やクエン酸回路関連物質の顕著な増加が認められ，キサントフィル合成に必要な基質や補酵素供給系の強化が示唆された。また，RH-7A 株では myo-inositol や ribose-5-phosphate の顕著な増加も認められた。これらの物質は ASX 生産微生物のヘマトコッカス藻における酸化ストレスマーカーとして報告されていたことから，オーランチオキトリウム属においても酸化ストレスが ASX 生産を誘導していることが推測された。そこで，酸化ストレス誘導物質として鉄イオンを培地へ添加すると，RH-7A 株及び RH-7A-7 株の ASX 生産量はそれぞれ顕著に増加した。演者らは以前，果物缶詰の廃シロップや，海洋バイオマスの褐藻の主要糖質マンニトールの微生物転換物を培養基質としたオーランチオキトリウムによるキサントフィルの生産を報告しており，これらの主要炭素源であるフルクトースで RH-7A-7 株を培養したところ，グルコースと同等の ASX 生産性を示し，本株が同未利用バイオマスからの ASX 生産に適用可能であることが示唆された。

Xanthophylls, *Aurantiochytrium* sp., metabolomics

発表責任者：秋 庸裕（aki@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A09a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A09 会場

ジアセトナミン塩酸塩添加による *Bacillus thuringiensis* 栄養増殖菌体での Cry-toxin 産生亢進の検証

Inspection of Cry-toxin induction in the vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* by exposure to diacetonamine-HCl

○浅里 仁美、池田 陽、キム ドンギョプ、橋床 泰之（北海道大学大学院農学院）
○Hitomi ASARI, Aki IKEDA, Dongyeop KIM, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ. Graduate School of Agriculture)

［**研究背景・目的**］*Bacillus thuringiensis* は，芽胞化の際に昆虫特異的タンパク性毒素である Cry-toxin を特徴的な 8 面体結晶として菌体内に大量に蓄積する。しかしながら *B. thuringiensis* が芽胞形成を開始する培養条件では菌体増殖が進みにくく，菌体増殖が盛んになる培養条件では Cry-toxin 産生と連動する芽胞形成が起こりにくい。従って，Cry-toxin 産生は大きく相反する二つの要因によって支配されており，鱗翅目昆虫以外の幾つかの目に対して殺虫効果を示す Cry-toxin 様タンパク質を産生する *B. thuringiensis* 近縁株には芽胞形成が極めて困難なものが認められている。そのような相反性を解決する目的で，大量に培養した栄養増殖細胞をそのまま芽胞誘導にもっていける芽胞分化誘導因子や芽胞化なしに Cry-toxin 様タンパク質を大量に蓄積させる機能性分化誘導因子の探索を行ってきた。本研究では，*Bacillus amyloliquefaciens* の芽胞形成誘導因子として，当研究室でオカラのメタノール抽出物から単離精製した diacetonamine (DA, synonym of 4-amino-4-methylpentan-2-one)[1] が *B. thuringiensis* の Cry-toxin 産生能を亢進できるか否かを検討した。

［**方法・結果**］*B. thuringiensis* NBRC 101235 株を用い，これを nutrient-broth (NB)培地あるいは Peptone-glucose (PG) 培地中で往復震盪培養 (30˚C, 24-48 h, 100 rpm)し，濁度 (optical density) が完全に 2.0 を越えた定常期の培養物に直接，あるいは遠心分離で集菌した菌体の MSG (Minimal Salts medium + Glutamate) 液体培地への懸濁液として，終濃度 400 μM DA 塩酸塩を添加し，さらに往復震盪培養 (30˚C, 48 h, 100 rpm)を行った。得られた培養液から菌体を採取し，これを集菌後，LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit® で蛍光染色したものを卓上蛍光顕微鏡下(1500 倍率)で観察し，芽胞形成率を求めた。MSG 培地では DA 塩酸塩添加区で高い芽胞形成が認められ，菱形状のタンパク質結晶が多数観察された。これは Cry-toxin のものであることを SDS-PAGE による回収タンパク質の分析で 70 kDa 付近のバンドとして確認した。一方，芽胞をほとんど形成しない高栄養培地に終濃度 400 μM DA 塩酸塩を添加し，72 時間培養し続けた菌体より抽出した全タンパク質から Cry-toxin に一致するバンドを検出した。現在，この栄養増殖菌体に Cry-toxin を効率よく産生させる条件を探索している。

1) A. Ikeda *et al.* Identification of diacetonamine from soybean curd residue as a sporulation-inducing factor toward *Bacillus* spp. *AMB Express,* **7**, 101 (2017). DOI 10.1186/s13568-017-0395-0.

Bacillus thuringiensis, Cry-toxin induction in vegetative cells, diacetonamine-HCl

講演番号：3A09a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A09 会場

単細胞微生物用界面バイオプロセスの特徴化と物質生産への応用
Characterization and application of interfacial bioprocess with unicellular microorganisms
○窪木 遥[1]、小田 忍[2]、大箸 信一[2] ([1]金沢工大院バイオ化学、[2]金沢工大ゲノム研)
○Haruka KUBOKI[1], Shinobu ODA[2], Shinichi OHASHI[2] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Kanazawa Inst. Technol.)

【目 的】
カビや放線菌による有用物質の生産には一般に液体培養法が採用されているが、菌の形態制御が困難であることや、カタボライト抑制の影響で物質を高生産できないことなどの問題がある。これらの問題点に対して有効なバイオリアクターとして、浮上性微粒子(MS)を用いて液体培地表面で微生物を増殖させる、液面固定化システム(Liquid-surface immobilization ; LSI)がある。本研究では、MS同士を付着させるバインダー材(BP)を添加して複合マットを強化する単細胞微生物用界面バイオプロセスについて、MS並びにBPの特性把握と最適化を図り、抗生物質の発酵生産における有効性を検証することを目的とした。
【方法】
MS の特性把握： 3 種類の MS の液面への浮上速度と菌体捕集率を測定した。菌体捕集率には 2 種の細菌と酵母を用い、MS 浮上後の水層内に残存する未捕集の菌体数を計測することで求めた。
BP の特性把握： BP として carboxymethylcellulose 製 Sunrose SLD-FM(日本製紙、平均粒経 20 μm、膨潤後平均粒径 58 μm、25 μm メッシュパス)を用い、BP/MS 層を回転振盪してその強度を評価した。
抗生物質の発酵生産： Natamycin 生産株の *Streptomyces chattanoogensis* NBRC12754 を LSI に適用し、3 種の MS 種を用いてその生産量を比較した。また、最も生産性の高かった MS の Advancell HB-2051(porous PMMA maicrosphere)について、natamycin 生産に対する阻害作用を液体培養法で評価した。
【結果】
MS の浮上速度が速いほど菌体捕集率が高い傾向にあったが、最も低い HB-2051 であっても 87%もの菌体捕集率を示し、実使用上は問題なかった。また、BP は SLD-FM を直接添加した場合よりも、25 μm メッシュパスで平均粒径を小さくしたものを添加した場合で MS 層の強度がより高くなった。抗生物質の発酵生産では、供試 MS の中で HB2051 が最も高い natamycin 生産量を与え、培養条件の最適化によってさらに向上した。また、HB2051 の *S. chattanoogensis* に対する増殖阻害を評価した結果、natamycin 生産に対する阻害はなく、HB2051 が存在しない場合よりも natamycin の生産性は向上していた。これらの結果から、MS と BP を使用した LSI システムは、抗生物質の発酵生産において有効なバイオプロセスであると決定づけられた。

liquid-surface immobilization, antibiotics, secondary metabolite

講演番号：3A09a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A09 会場

紙パルプ発酵液からのポリベンズイミダゾール系ポリマー原料 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の精製プロセスの開発

Development of the purification process of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid, a start-up material for polybenzimidazole, from fermentation broth of kraft pulp hydrolysate

○齋藤 駿[1,2]、勝山 陽平[1,2]、宮崎 翔子[2,3]、川口 秀夫[2,3]、荻野 千秋[2,3]、アシフ モハメドアリ[2,4]、金子 達雄[2,4]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]JST・CREST、[3]神戸大院・工、[4]北陸先端大院)
○Shun SAITO[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,2], Shoko MIYAZAKI[2,3], Hideo KAWAGUCHI[2,3], Chiaki OGINO[2,3], Mohammad Asif Ali[2,4], Tatsuo KANEKO[2,4], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]JST・CREST, [3]Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., [4]JAIST)

【背景・目的】　化成品・プラスチック原料の生産において、石油に依存した化学変換プロセスは環境負荷が大きく、石油資源も有限であるため、バイオマスの利用が望まれている。一方、芳香族ポリマーであるポリベンズイミダゾール（PBI）は、高い耐熱性と機械的強度を示すスーパーエンプラであり、金属代替素材など多様な用途展開が期待されている。そこで、我々はバイオマスから PBI 系新規ポリマーを生産する一貫プロセスの構築を目指し研究を進めている。3-amino-4-hydroxybenzoic acid（3,4-AHBA）は、PBI 系ポリマーの原料となる物質である。これまでに我々は、*Streptomyces griseus* 由来の 3,4-AHBA 合成酵素をコードする 2 遺伝子（*griH, gril*）を発現させた組換えコリネ型細菌を利用することで、バイオマス（紙パルプ）を原料として最大で 3.3 g/L の 3,4-AHBA を生産する系を構築している。一方、ポリマーの重合には高純度な 3,4-AHBA を得る必要があるが、3,4-AHBA は非常に高極性な両性イオン物質であり、その精製法の確立が一貫生産プロセス構築の大きな障壁となっていた。そこで、紙パルプを原料とした発酵液より、3,4-AHBA を効率的かつ高純度で精製するプロセスの確立を試みた。【方法・結果】　コリネ菌発酵液中には、3,4-AHBA と類似した化学的性質を有する各種アミノ酸が多く含まれている（例：Lysine 2.6 g/L, Asn 0.5 g/L）。そこでまず、3,4-AHBA と各種アミノ酸の分離方法を検討した。一般的に、アミノ酸の分離にはイオン交換樹脂が選択されるため、本樹脂の種類や発酵液の pH 等の各種検討を行ったが、分離は困難であった。そこで、極性物質の精製に適した様々な樹脂を検討したところ、逆相・陽イオン交換樹脂 PoraPak Rnx CX [Waters] や各種修飾シリカゲル（Diol silicagel［富士シリシア］等）により、3,4-AHBA と各種アミノ酸を分離することに成功した。しかし、このアミノ酸を除去した画分にはアミノ酸以外の水溶性の未知物質が多数含まれていた。そこで、これらの水溶性化合物の除去を検討した結果、通常のシリカゲル及び ODS カラムクロマトグラフィーにより、これらの不純物を分離することに成功した。一方、発酵液中あるいは精製過程において、3,4-AHBA の非酵素的な二量体物質 2-aminophenoxazin-3-one-8-carboxylic acid（APOC）が生じるが、最終的にこれを除去する必要があったため、精製の最終工程として、酢酸エチルと水による液々抽出を行い、APOC を分離した。以上の精製プロセスにより、高純度の 3,4-AHBA を紙パルプ発酵液から取得することに成功したが、現時点での 3,4-AHBA の回収率は約 60%程度であり、今後更なる検討が必要である。現在、コリネ菌発酵液から精製した 3,4-AHBA を使用し、PBI 系ポリマーの作製を試みている。

Biomass, Polybenzimidazole, 3-amino-4-hydroxybenzoic acid

発表責任者：齋藤駿（assaito@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A09p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A09 会場

２種のガス状アルカン酸化酵素生合成過程追跡のための実験系の確立

Establishment of the experimental system for pursuing biosynthesis process of two kinds of gaseous alkane monooxygenase

○林 大祐[1]、寶関 淳[1,2]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1]([1]京大院農応用生命、[2]京都学園大バイオ環境)
○Daisuke HAYASHI[1], Jun HOSEKI[1,2], Hiroya YURIMOTO[1], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyotogakuen Univ.)

（目的）ガス状アルカンは燃料として直接利用される他、液体アルコールへと酸化してから輸送、あるいは、直接、有用物質生産原料として利用されることが望ましい。しかし、ガス状アルカンの酸化反応は非常に強い CH 結合の活性化を伴い、非常に困難な反応であることから、常温常圧条件下で本反応を行うアルカン酸化酵素の利用が期待されている。しかしアルカン酸化酵素を異宿主で発現させても封入体を形成し、活性型酵素を得ることは困難であり、このことがアルカン酸化酵素の応用利用ばかりでなくアルカン酵素反応原理の理解へも大きな障壁となっている。我々は、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)を始めとするアルカン酸化酵素の生合成過程の理解から異宿主における活性発現を目指している。本研究では、当研究室において単離したメタン資化性菌 *Methylovulum miyakonense* HT12 とプロパン酸化菌 *Gordonia* sp. TY-5 を用いて、細胞質局在性 MMO(sMMO)およびプロパン酸化酵素（PMO）の生合成過程の解明を目的として研究を行った。

（方法・結果）まず *M. miyakonense* HT12 を用いて sMMO の誘導合成条件について検討した。一般に、sMMO 及び膜局在性 MMO(pMMO)は、銅イオン濃度によって発現調節されることが知られているが、0.01% Trypton の添加が sMMO の発現を強く抑制することを見出した。この知見を利用し、メタンを単一炭素源として生育させた後、Trypton 非含有培地にシフトすることにより、sMMO の生合成過程を追跡するための誘導合成系を確立した。さらに本菌における放射性同位体を用いたパルス-チェイス実験系も確立し、現在、sMMO 誘導時に特異的に誘導され、sMMO と相互作用するタンパク質の同定を目指している。

一方、*Gordonia* sp. TY-5 は、プロパン以外の様々な炭素源を用いて生育でき、その後、プロパンのみならず 2-プロパノールにより PMO を誘導できる点で、アルカン酸化酵素の誘導合成の解析に有利である。今回、*Gordonia* sp. TY-5 の形質転換系を新たに構築した。PMO オペロン下流にシャペロン様遺伝子 *prmG* を見出し、その遺伝子破壊株の取得にも成功した。本遺伝子破壊株の表現型についてもあわせて報告する。

このように２種のアルカン酸化酵素 sMMO と PMO の生合成過程を追跡するための培養手法、遺伝学的生化学的解析手法を確立した。

Gaseous alkane monooxygenase, Biosynthesis process, Bacteria

講演番号：3A09p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A09 会場

卵殻膜分解活性を示す微生物由来エラスターゼの検索と特性解析

Selection and characterization of bacterial elastase that can degrade egg shell membrane

横山 萌[1]、○竹中 慎治[1]、吉岡 泰淳[2]、山下 陽子[1]、芦田 均[1]([1]神戸大院農・生命機能、[2]神戸大院科学技術イノベ)
Moe Yokoyama[1], ○Shinji Takenaka[1], Yasukiyo Yoshioka[2], Yoko Yamashita[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Kobe Univ. Sci. Technol. and Innov.)

【目的】卵殻膜は皮膚の保湿効果やコラーゲン合成の促進作用などの生理作用を示すと報告されていることから化粧品、医薬品およびサプリメントの開発分野において潜在的な利用価値がある素材と期待されるが、あまり利用されていない。その要因として、卵殻膜が水に不溶な生体膜のため、そのままでは利用しにくいことが挙げられる。我々は、微生物酵素による温和な条件での分解と可溶化法の開発を目的として卵殻膜分解酵素の検索とその特性解析を行ってきた[1)]。本研究では、既報の酵素（*P. aeruginosa* ME-4 LasB）の配列情報から新たに分解酵素を検索し、その特性を明らかにしたので報告する。
【方法】プロテアーゼおよび卵殻膜分解酵素活性の評価：ME-4 株[1)]を対照とし、NBRC から購入した細菌 7 株について培養後、得られた培養上清のカゼイン、エラスチン-オルセインおよび卵殻膜に対する分解活性を調べた。卵殻膜分解酵素の遺伝子発現：NBRC103045 株のプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、pET28b(+)ベクターに組み込んだ後、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で発現させた。酵素精製：前報を参考に[1)]、不溶性タンパク質をアセトン処理により活性体を調製し、DE52 カラムクロマトグラフィーにより精製した。
【結果】ME-4 由来 LasB の一次配列（ME4_LasB, accession no. AB618054）[1)]を基にデータベースにより類縁酵素（Peptidase M4 superfamily; elastase, hemagglutinin 等）を検索したところ、*P. aeruginosa* 以外に *Aeromonas* 属、*Bacillus* 属、*Collimonas* 属、*Janthinobacterium* 属および *Pseudomonas* 属の細菌由来プロテアーゼが 30～80%の類似性を示した。各種加水分解酵素活性の結果を基に、NBRC103045 株のプロテアーゼ（IMT_LasB, identity with ME4 protease: 207/300 a.a., 69%）を用いることにした。部分精製した IMT_LasB を用いて前報[1)]で確立した条件にて卵殻膜分解を行った結果、ME4_LasB を用いた場合と同程度の可溶性のペプチドやタンパク質の遊離が見られた。IMT_LasB を大腸菌形質転換株で発現させたところ、ほとんどが不溶性タンパク質であったがアセトン処理をすることによりリフォールディングが可能となり、活性は約 200 倍となり DE52 カラムクロマトグラフィーにより単一に精製できた。現在、温度（45℃）や pH（8.0）以外の卵殻膜分解の最適化条件を確立すべく、組換え IMT_LasB の特性解析を進めている。本研究の一部は、財団法人旗影会平成 29 年度研究助成により行った。
１）Takenaka et al., Biotechnol. Lett., 34: 949-955 (2012)

eggshell membrane, elastase, *Pseudomonas*

発表責任者：竹中　慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A09p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A09 会場

Proteomic and biochemical analyses of plant biomass-degrading capabilities from novel insect-associated cellulolytic Streptomyces

○Keisuke OHASHI, Taichi TAKASUKA (Hokkaido Univ.)

Wood devastating insects such as wood wasp, bark beetle and others can extract carbon sources from cellulose and hemicellulose, a major components of plant cell wall. Depolymerization of these polysaccharides is achieved by associated symbiotic microbes, which secrete extracellular proteins including glycoside hydrolases, lytic polysaccharide monooxygenases and other enzymes required for decomposition of cellulose and hemicellulose. Previous studies revealed that *Streptomyces.* sp. SirexAA-E isolated from the wood wasp has high cellulose-degrading activity with comparable activity to the commercial enzyme cocktail derived from a genetically modified cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* Rut-C30. Detailed biochemical and proteomic analyses demonstrated that *S.* sp. SirexAA-E secretes a suite of enzymes involved in lignocellulose decomposition depending on different carbon sources used in the growth medium. To discover other cellulolytic insect-symbiont *Streptomyces* spp., 224 *Streptomyces* isolates out of currently available 1141 *Streptomyces* were examined for their cellulose-degrading ability, and 19 novel isolates, all from insect symbionts, were identified to possess highly cellulolytic potential.

To determine the key enzymes that contribute to efficient lignocellulose degradation of above 19 strains, we cultivated these strains on different carbon sources including cellulose, hemicellulose and chemically pretreated plant biomass. Culture supernatants were examined for the reactivities to various substrates and were subjected to proteome analyses. As was expected, majority of enzymes involved in the lignocellulose decomposition were shared among the highly cellulolytic *Streptomyces*, while several enzymes were only found in the strains that showed different reactivities to cellulose and hemicellulose.

Biomass-degradation, Proteomics, Streptomyces

講演番号：3A09p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A09 会場

植物アルカロイド分解微生物の探索

Screening of plant alkaloid-degradeing microorganisms

○熊野 匠人、栗崎 誠、木村 澪、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Takuto Kumano, Makoto Kurisaki, Mio Kimura, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】

ピペリンは３級アミド結合を有する植物アルカロイドで、コショウに含まれる辛味成分である。ピペリンに特徴的な生理活性として薬剤の生物学的利用能の向上が知られている。例えばウコンに含まれる抗酸化物質であるクルクミンの場合、ピペリンを同時に摂取すると生物学的利用能が約 2,000 倍上昇するとされている。これは肝臓での薬物代謝に関与する酵素がピペリンによって阻害されるためである。一方で、ピペリンを分解することのできる酵素も存在すると考えられるがこれまでに報告はない。そこで、本研究ではピペリン分解酵素の同定と機能解明を目的とした。

【方法・結果】

本研究ではまず、ピペリンを単一炭素源とする液体培地を用いて、数回の植継ぎを行う集積培養によって、ピペリン資化能をもつ複数の菌の単離に成功した。次に単離した菌株毎に代謝活性の比較を行った。その結果、最も強いピペリン分解活性を示した菌を 16SrRNA 配列により同定した。また同時に、LC/MS 分析により、ピペリンの代謝産物と考えられる化合物について同定を行った。

plant alkaloid, microorganism, metabolism

講演番号：3A10a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A10 会場

超好熱性アーキアへのキシラン分解能の付与
Alteration of metabolic pathway of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*: biodegradation of xylane

○福田 青郎[1]、林 千広[1]、大垣 裕亮[1]、川村 実央[1]、佐藤 喬章[2]、金井 保[2]、跡見 晴幸[2]、今中 忠行[1] ([1]立命館大生命、[2]京大院工)
○Wakao FUKUDA[1], Chihiro HAYASHI[1], Yusuke OGAKI[1], Mio KAWAMURA[1], Takaaki SATO[2], Tamotsu KANAI[2], Haruyuki ATOMI[2], Tadayuki IMANAKA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】近年地球温暖化や環境破壊に対する懸念から、化石燃料に依存せず、持続的な利用が可能で、食糧との競合も起こらないバイオマスの活用が注目されている。特に自然界においてセルロースに次いで多量に存在する植物細胞壁成分・ヘミセルロースや甲殻類の外骨格を形成するキチンなどについて、微生物を利用した分解・利用は世界的に広く関心が集まっており、研究が進められている。一方で微生物の工業的利用を考えた場合、好熱菌そのものや超好熱菌が生産する耐熱性酵素は、「広い温度範囲で長時間使用できる」「雑菌汚染の心配が少ない」「溶けにくい多糖などでも、基質の溶解度の上昇により反応が進みやすい」等の理由から工業的に利用しやすいと考えられており、耐熱性酵素を生産する好熱菌にも期待が高まっている。以上のような観点から、好熱菌による簡便な未利用バイオマスの利用法を確立することは、安価でクリーンなエネルギー供給の一端を担うと期待される。このような観点から本研究では、高い水素生産能を有する超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の代謝経路を改変して、キチン・キシランなどの非食性バイオマスからの水素生産を目指した。
【実験結果】大分県の別府温泉サンプルや、家庭用コンポスト、立命館大学周辺の土壌を分離源として、難分解性多糖であるキチンまたはキシランの分解菌のスクリーニングを行った。その結果、いくつかのキチン分解菌やキシラン分解菌が得られた。その中でも別府温泉白池地獄の温泉サンプルより、70℃で生育可能なキシラン分解菌（*Caldicellulosiruptor* 属細菌 45-6 株）の単離に成功した。45-6 株について全ゲノム DNA のドラフト解析を行ったところ、ゲノム上に xylanase 遺伝子ホモログ（3 種）をはじめとし、xylosidase 等のキシラン分解関連の酵素や、xylose isomerase や xylulokinase といった気ロース代謝に関わる遺伝子が多数見出された。これらのうち特に β-1,4-xylanase（*xyl*1, 2, 3）をコードすると予想された遺伝子についてその性質を解析した。組み換え型 Xyl1 を取得し酵素活性を測定したところ、超好熱菌 *T. kodakarensis* の至適生育温度である 85℃においても 2 時間以上の間 50%以上の酵素活性を維持するという高い耐熱性を有することも分かった。そこで *xyl*1 について分泌タンパク質として発現するように *T. kodakarensis* ゲノムに組み込んだ。野生株及び得られた *xyl*1 導入株をキシラン含有固体培地上で生育させたところ、*xyl*1 導入株コロニー周辺では、野生株コロニーでは見られなかったキシランの分解帯が観察された。このように *T. kodakarensis* にキシラン分解能を付与することに成功した。今後は必要に応じてキシラン資化に関する遺伝子を追加導入していく予定である。

hyperthermophiles, xylane, xylanase

講演番号：3A10a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A10 会場

ニトロ還元酵素の解析と芳香族アミン生産への利用

Enzymatic reduction of aromatic nitro compounds to aromatic amines with nitroreductases

○川﨑 志慧、桝尾 俊介、皆川 一、高谷 直樹 (筑波大生命環境)
○Yukie Kawasaki, Shunsuke Masuo, Hajime Minakawa, Naoki Takaya (Univ. Tsukuba)

【背景･目的】 ポリマー原料となる芳香族アミンのバイオマスからの生産は持続可能な社会の構築のために重要である。我々はこれまでに大腸菌の代謝工学的改変によりグルコースを原料として 4-アミノフェニルピルビン酸、4-アミノフェネチルアミン、4-アミノフェニルアラニン、4-アミノ桂皮酸(4-aminocinnamic acid, 4ACA)、4-アミノヒドロ桂皮酸などの様々な類縁体を創製してきた(1, 2)。工業的に芳香族アミンは芳香族化合物のニトロ化と生成するニトロ基の還元の二段階の反応によって化学的に製造されており、生物界では後者の反応を行う酵素としてニトロ還元酵素が知られている。ニトロ還元酵素は活性化に NAD(P)H を必要とするフラビンタンパクでバクテリアを中心に広く分布する。大腸菌においても NfsB などのニトロ還元酵素が知られており、生化学的研究が進められている。

【結果･考察】 大腸菌野生株の休止菌体を触媒として 4-ニトロ桂皮酸(4-nitrocinnamic acid, 4NCA)の 4ACA への還元を試みたところ、4ACA への還元効率は 5% mol mol^{-1} であった。そこで様々な生物由来のニトロ還元酵素の探索を行い、芳香族ニトロを芳香族アミンへ効率的に変換する大腸菌株の創生を試みた。pRSFDuet-1 ベクターを用いて大腸菌由来の *nfsB*、酵母由来の *scfrm2* または *schbn1*、および 12 種の推定ニトロ還元酵素遺伝子をそれぞれ発現する大腸菌株 16 種を作製し、得られた菌体を用いて 4NCA の還元を検討した。その結果、クロストリジウム由来のcdFLDZ および酵母由来の scFrm2 または scHbn1 を発現させた組み換え大腸菌株が 4NCA を効率的に 4ACA に還元することが示された。この時の変換効率は 60% mol mol^{-1} 以上であった。また、cdFLDZ 発現株による還元反応は酸素感受性であったのに対し scFrm2 発現株と scHbn1 発現株による反応は酸素非感受性であった。scFrm2, scHbn1 の組み換えタンパク質を精製したところニトロ還元酵素の一般的な基質である 4-ニトロキノリン N-オキシドを還元した。本大会ではこれらニトロ還元酵素の性質と芳香族アミンの生物生産への利用について報告する。

1. Masuo S, Zhou S, Kaneko T, Takaya N. 2016. Bacterial fermentation platform for producing artificial aromatic amines. Sci Rep 6:25764.
2. Kawasaki Y, Aniruddha N, Minakawa H, Masuo S, Kaneko T, Takaya N. 2017. Novel polycondensed biopolyamide generated from biomass-derived 4-aminohydrocinnamic acid. Appl Microbiol Biotechnol. (in press)

nitroreductase, aromatic amine, 4-aminocinnamic acid

講演番号：3A10a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A10 会場

合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
Improved enzyme complex expression for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○神藤 定生[1]、内山 友香[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2] ([1]名城大理工、[2]名城大農)
○Sadanari JINDOU[1], Yuka UCHIYAMA[2], Akifumi HOSODA[2], Hiroto TAMURA[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ. Agri.)

エチレンはプラスチックなどの石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。いっぽう、資源枯渇や気候変動などの課題が顕在化するなか、CO_2の削減による持続可能な社会の構築および脱石油依存社会の実現は喫緊の課題である。そこで、我々は CO_2 から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築し、石油を原料やエネルギー源に用いない、新規なエチレン製造法の基盤技術を確立した。

具体的には、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を複合体化(SOC2)させ、これをシアノバクテリア Synechococcus elongatus PCC 7942 へ導入し SOC2 株とした。結果、当該細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した。また、酵素複合体の形成により 3.7 倍高いバイオエチレン合成活性を得た(Jindou *et al., ACS Synth. Biol.*, 2014)。

いっぽう、さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、酵素複合体の酵素組成の変更による以下の反応系最適化を行ってきた。具体的には、SOC2 を構成する 2 種のキメラ酵素サブユニット(ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc)の複合体内モル比が 1：2 となるよう、これに対応するキメラ骨格タンパク質 Cip3B を保持するバイオエチレン生産株 SOC3B 株を構築した。組換え体からのバイオエチレン生産量をガスクロマトグラフィー(GC)で定量した結果、既存の SOC2 株と比較して、1.7 倍高いバイオエチレン生産量増加を示した。また、メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を既存の SOC2 株へ組み込んだバイオエチレン生産株 SOC3D2 株を構築した。結果、既存の SOC2 株と比較して、SOC3D2 株は 1.9 倍のバイオエチレン生産量増加を観察した。

以上で得られた、酵素の組成変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値より、ACS:ACO:MTAN=1:2:1 の各酵素モル比を持つ酵素複合体は SOC2 株比 3.2 倍のバイオエチレンを生産可能と考えられた。そこで、これを検討する事を目的として、本研究では新規の SOC4 株を構築し、これを保持するシアノバクテリアのバイオエチレン生産効率を GC で定量したので、この詳細を報告する。

Synechococcus, Ethylene, Cellulosome

発表責任者：神藤定生（sjindou@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3A10a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A10 会場

大腸菌の D-アラニン排出輸送体の同定
Identification of the D-alanine exporter in *Escherichia coli*
○酒井 啓一郎、勝部 哲、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大農）
○Keiichiro SAKAI, Satoshi KATSUBE, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ)

【目的】当研究室ではこれまで大腸菌の L-アラニン(L-Ala)代謝に注目し、3 つの L-Ala 合成酵素と２つのアラニンラセマーゼ遺伝子を欠失させ、L-Ala を完全に代謝できなくなった L-Ala/D-Ala 要求性変異株を構築し、この変異株から L-Ala を含むジペプチド(Ala-Ala)高感受性変異株を選択することによって L-Ala 排出能を失った変異株を取得した。次いで、この Ala-Ala 高感受性を相補するクローンを選抜することによって、4 つの L-Ala 排出輸送体遺伝子(*ygaW*, *ytfF*, *yeaS*, *yddG*)を取得し、*ygaW* が最も L-Ala 排出活性の高い主要な L-Ala 排出輸送体であることを明らかとしてきた。このような背景から、大腸菌が光学異性体である D-Ala の排出システムを有する可能性を考え、D-Ala 分解経路である D-アミノ酸脱水素酵素(DadA)欠損株を Ala-Ala 存在下で培養し、その上清中の D-Ala を HPLC で調べた結果、野生株では認められなかった D-Ala が DadA 欠損株では分泌されていることを発見した。そして、YgaW 欠損変異株から調整した反転膜小胞内への[^{3}H]D-Ala の蓄積がエネルギー依存的に起こることを見いだし、大腸菌が D-Ala 排出システムを有することを明らかとした。そこで本研究では、この D-Ala 排出能を担う輸送体の同定を試みた。
【方法】大腸菌の全遺伝子をクローン化したライブラリーである ASKA クローンの中から、これまで知見のない内膜タンパク質を中心とした 396 クローンを選び、大腸菌の D-アラニン要求株 MB2795 を指示菌としたバイオアッセイ法に供し、D-アラニン分泌能のあるクローンを探索した。次いで、選抜した遺伝子を欠損した株とその高発現株を用い、細胞内への[^{3}H]D-Ala の蓄積量を調べ、選抜したこれらの膜タンパク質の D-Ala 排出活性を評価した。
【結果】D-Ala を含有しない L-寒天培地に MB2795 を混釈した平板上に YgaW を高発現する株をスポットして培養すると MB2795 の生育ハローが認められたことから、YgaW は D-Ala 排出活性を有していることが示唆された。また、それ以外にも 4 つの遺伝子(*yraM, yciC, ymcD, yidH*)を高発現する株において MB2795 の生育ハローが認められた。次いで、これらの遺伝子産物が D-Ala 排出活性を有しているか検証するために、各遺伝子欠損株とそれらの高発現株を用い、細胞内への[^{3}H]D-Ala の蓄積量を測定した。その結果、YgaW 高発現株において著しい[^{3}H]D-Ala 蓄積量の低下が認められ、YgaW が D-Ala 排出能を有することが明らかとなった。また、*yraM* と *yidH* 高発現株では蓄積量の低下が見られなかったが、*yciC* を高発現する株において[^{3}H]D-Ala の蓄積量の低下が認められ YciC も D-Ala 排出活性を有するものと考えられた。

Escherichia coli, exporter, D-alanine

講演番号：3A10a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A10 会場

リン酸存在における最適な土壌金属量の解析

Analysis of the best amount of metals to keep phosphoric acid in soil

○嶋岡 邦彦、DINESH Adhikari、荒木 希和子、久保 幹（立命館生命科）
○Kunihiko SHIMAOKA, Adhikari DINESH, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Retsumeikan Univ.)

土壌中の金属元素の欠乏により、植物は葉の黄化、根毛の未発達などの生育阻害を引き起こすことが確認されている。土壌中の金属欠乏を改善するためには、土壌中に金属成分を加える必要がある。さらに金属を植物に吸収させるためには、金属は交換性で存在する必要がある。交換性金属とは、土壌粒子に結合しており、植物が吸収できる金属の形態のことを示す。しかし、土壌中の金属量が過剰である場合、金属が植物の成長に必要であるリン酸と結合し、植物はリン酸を吸収することができなくなる。したがって、植物の成長を促進させることにおいて、土壌中に含まれる成分を分析し、最適な状態に維持されるよう、金属の供給量を調整する必要がある。これまで、pH 6.5~7.0 付近は金属がリン酸と結合しない pH 域であることが確認されている。そこで本研究では、土壌中の金属とリン酸の吸着、物質循環ならびに pH の関係を調べることを目的とした。

はじめに、自然界での土壌環境を調べるために、野外の土壌 230 サンプルのリン循環活性評価値(土壌にフィチン酸を加え、有機態リンから可溶性リンへの移行速度を測定)、交換性 Ca、交換性 Fe、交換性 Al、pH を測定した。その結果、酸性土壌（pH 4.0~ 5.5）においては Fe と Al 量が増加するにつれてリン循環が減少し、アルカリ性土壌（pH 7.5~8.0）においては Ca 量の増加にともないリン循環が減少した。これに対し中性付近（pH 6.5~7.0）では、リン循環の高い土壌が多く確認された。この結果から、中性土壌（pH 6.5~7.0）がリン循環にとって最適な土壌状態であることがわかった。

次に、調整した土壌を用いて、上記の傾向を確認するための実験を行った。バーミキュライト、山土を 1:1 の割合で混合したものに、牛糞と油かす（各 5%）を加えた土壌を作製した。土壌の水分量を最大保水率の 60%に調整し、1 週間静置した後、金属含有資材（鉄鋼スラグ由来のミネカル、HDSP、OT、石灰石)もしくは試薬（$CaCO_3$、$Ca(OH)_2$、$Fe(OH)_2$、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$）を加え、上記の項目を測定した。加えた金属資材の量および種類によって値は異なり、pH 6.5~7.3 の土壌で最もリン循環活性評価値は高かった。そこで土壌 pH を中性付近（pH 6.5~7.0）に調整し、異なる金属含有資材を加えて同様の実験を行った結果、同じ中性付近の pH であってもミネカルなどの鉄鋼スラグを加えたほうが $CaCO_3$ などの試薬を加えた場合よりもリン循環活性評価値の減少が顕著であった。この結果から、リン循環の減少は pH の変動による金属化合物の変化によるものと金属資材に含まれる金属の存在形態によるものがあることが示唆された。このことから、pH 値とともに金属資材に含まれる金属の化合形態を考察する必要があることがわかった。

Phosphorus circulation, metals, pH

講演番号：3A10a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A10 会場

糸状菌胞子を用いた新規な微生物変換プロセス
Novel bioconversion systems with fungal spores

○林 優佑[1]、宮崎 裕人[1]、小田 忍[2]、大箸 信一[2] ([1]金沢工大院バイオ化学、[2]金沢工大ゲノム研)
○Yusuke HAYASHI[1], Yuto MIYAZAKI[1], Shinobu ODA[2], Shinichi OHASHI[2] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Kanazawa Inst .Technol.)

【目 的】

微生物変換法はその位置・立体選択性の高さから、医薬品原料などの合成において威力を発揮する。しかし医薬品原料の多くは水に対する溶解性が低く、疎水性有機溶媒に対する溶解性も高くはない。したがって、Log *P* が 1.5 ~ 4.0 程度の中極性有機溶媒を生体触媒反応に利用できれば、微生物変換法の適用範囲を大きく拡大できると思われる。しかし、これらの中極性有機溶媒の多くは強い微生物毒性を発揮することが知られており、基質・生成物の溶解性と微生物毒性との間にジレンマが生じることになる。一方、糸状菌胞子は栄養細胞に比べて強い有機溶媒耐性を示すうえに、水中で様々な微生物変換反応を触媒することが報告されている。そこで本研究では、糸状菌胞子を利用することで、中極性～疎水性有機溶媒中の基質を効率的に微生物変換し得るバイオプロセスの開発を目的とした。

【方 法】

モデル反応には *Aspergillus sojae* NBRC 32074 による benzil から benzoin への不斉還元反応を設定した。*A. sojae* NBRC 32074 胞子を PD 寒天培地より回収し、ガーゼで菌糸をろ別した。その後、遠心分離による洗浄を繰り返した。

二相系反応：ヒドリド源を添加した *A. sojae* NBRC 32074 胞子懸濁液 1 ml に benzil を溶解させた有機溶媒 1 ml を添加した。そこにガラスビーズを投入し、25 °C、200 rpm で振とう反応させた。

ゲル包括固定化反応：ヒドリド源を添加した *A. sojae* NBRC 32074 胞子懸濁液と Na-alginate 水溶液を混合し、この懸濁液を $CaCl_2$ 水溶液に滴下し包括固定した。これに含基質有機溶媒 2 ml を添加し、25 °C、200 rpm で振とう反応させた。

【結 果】

糸状菌胞子を用いることにより、栄養細胞では使用不能と考えられていた Log *P*=1.76 の有機溶媒中でも補酵素要求性の還元反応を行うことができた。この低 Log *P* 値の *tert*-butyl acetate を溶媒とした高濃度 benzil 溶液の反応では、効果的に benzoin の生産量が向上した。更に、Ca-alginate による包括固定化胞子を用いることで繰返し反応を試みた。本法の反応条件の最適化についても検討した。

fungal spore, solvent-tolerance, bioconversion

講演番号：3A10a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A10 会場

遺伝子組換え *Acinetobacter* sp. Tol 5 を用いた citral の生物変換に関わる代謝経路の特定

Identification of metabolic pathways involved in the biotransformation of citral by using a genetically engineered *Acinetobacter* sp. Tol 5

○宇佐見 享嗣、石川 聖人、堀 克敏（名大院工）
○Atsushi USAMI, Masahito ISHIKAWA, Katsutoshi HORI (Nagoya Univ.)

【目的】構造多様性に富む植物テルペノイドは医薬、機能性食品、香料、工業原料として利用される重要な化合物群である。レモングラスやメリッサの精油主成分である citral は geranial と neral の幾何異性体混合物モノテルペンアルデヒドである。これまでに citral を基質として用い、生物の持つ異物代謝酵素を利用した生物変換による代謝生成物がいくつか報告されている。基質だけでなく、これら代謝生成物は食品や化粧品など広い分野で利用されていることから、有用物質生産としても注目されている。しかし、citral を構成する各異性体は容易に転化や自然酸化する不安定な化合物であるため、単一基質として用いることが困難であり、各異性体から代謝生成物に関わる経路は明らかではない。我々は、geraniol と nerol を geranial と neral にそれぞれ変換する酵素（GeoA）を遺伝子工学的に生物宿主へ導入すれば、citral の各前駆体から各異性体を細胞内にて生産することができ、これらを単一基質とした生物変換を実施できるのではないかと考えた。本研究では、多様な化合物に対し耐性と代謝能力を有し、*geoA* のオルソログを持たず、遺伝子組換え手法が確立している *Acinetobacter* sp. Tol 5 を生体触媒に用い、citral の生物変換に関わる代謝経路を明らかにすることを目指した。

【方法】基質として 80 mM の citral を含む無機塩培地で Tol 5 株による生物変換を行い、14 日間の継時変化を TLC および GC-MS により調べた。自然酸化生成物の解析においては、菌体を含まない状態で上記同様の操作にて行った。これら生成物は GC-MS により同定および NMR などの機器分析により構造決定した。また、Tol 5 に *geoA* を導入した形質転換体を作成し、前駆体を基質に用い代謝生成物への代謝経路を継時変化により検討した。

【結果】Citral を基質に用いた継時変化の結果から、Tol 5 株を含む培地には 8 種、含まない培地からは 7 種の生成物をそれぞれ検出し、少なくとも 1 種の異物代謝生成物の存在を確認した。*geoA* 遺伝子導入 Tol 5 株を用いた citral 前駆体の生物変換の結果、Tol 5 株は geranial から特異的に 2 種の代謝生成物を生産し、neral に対しては変換反応が進行しないことを明らかにした。また、自然酸化反応が進行しないことも明らかにした。以上の結果から、遺伝子工学的手法を用い、不安定な基質の生物変換をその前駆体から検討する本手法は、困難であった生産物の代謝経路の特定を容易にすることが示された。

Acinetobacter sp. Tol 5, biotransformation, genetic engineering

講演番号：3A10a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A10 会場

ジオール類の不斉酸化による光学活性ヒドロキシアルカン酸の微生物合成
Microbial synthesis of optically active hydroxyalkanoates by asymmetric oxidation of diols
○菊川 寛史[1]、子安 伶奈[2]、八十原 良彦[3]、伊藤 紀幸[3]、滿倉 浩一[1]、吉田 豊和[1] ([1]岐阜大工・化生工、[2]岐大院工・生命工、[3]（株）カネカ)
○Hiroshi Kikukawa[1], Rena Koyasu[2], Yoshihiko Yasohara[3], Noriyuki Ito[3], Koichi Mitsukura[1], Toyokazu Yoshida[1] ([1]Dept. Chem. Biomol. Sci., Gifu univ., [2]Grad. Sch. Eng., Gifu univ., [3]Kaneka corp.)

【背景・目的】
光学活性ヒドロキシアルカン酸は医薬合成中間体、機能性ポリマー原料など広範に利用される化合物である．近年，グリーンケミストリーの観点から，有用ヒドロキシアルカン酸の微生物・酵素を利用した効率的な生産法の確立と化学合成法からの転換が求められている．本研究室では，光学活性ヒドロキシアルカン酸の新規合成法として，プロキラルな両末端ジオールがもつ 2 つのヒドロキシメチル基のうち一方にのみ作用する選択的酸化（不斉酸化）による光学活性ヒドロキシアルカン酸の酵素合成法を発案した．本研究では，両末端ジオールを単一炭素源とする集積培養により両末端ジオールを不斉酸化する微生物酵素を土壌から見いだし，微生物酵素反応の諸性質解明と反応条件の最適化を目指した．

【方法・結果】
二置換ジオール 2,2-diethyl-1,3-propanediol (DEPD)を単一炭素源として土壌微生物の集積培養を行った．単離菌の培養上清を TLC 分析した結果，3 株においてカルボン酸の生成を検出した．さらに，3 株の培養上清を HPLC・NMR 分析に供した結果，１株において DEPD 由来のヒドロキシアルカン酸 2-ethyl-2-(hydroxymethy)butanoic acidの生成を確認した．16S rDNA 解析より，この株を *Rhodococcus* sp. 2N と同定した．
2N 株の培養条件を検討した結果，2N 株のもつ酸化活性は誘導性を示し，0.3% (w/v) DEPD を添加した栄養培地で 2.5 日間培養することで 2N 株は最大活性を示した．また，2N 株の調製菌体を用いた変換反応により基質特異性を評価した結果，2-ethyl-2-methyl-1,3-propanediol (EMPD)で 102%，2-methyl-1,3-propanediol で 166%の相対活性を示した．さらに，60 mM DEPD 及び EMPD を基質としてヒドロキシアルカン酸の生産性を評価したところ，それぞれ 56 mM (変換率 93%)，28 mM (変換率 47%)のヒドロキシアルカン酸生産を達成した．このとき，EMPD 由来のヒドロキシアルカン酸である 2-(hydroxymethyl)-2-methylbutanoic acid を抽出・誘導体化しキラルカラム HPLC で分析した結果，その光学純度は 65%*ee* (*R*)であった．これにより，*Rhodococcus* sp. 2N が両末端ジオールの不斉酸化活性を有することを確認し，本酵素法による光学活性ヒドロキシアルカン酸生産が可能であると明らかとなった．

Hydroxyalkanoate, Asymmetric oxidation, *Rhodococcus*

発表責任者：菊川　寛史（kikukawa@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A10a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A10 会場

大腸菌を宿主とした人工代謝経路による糖質炭素源からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体生合成

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymer from sugars by artificial pathway in *Escherichia coli*

○齊藤 周、折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭（東工大院・生命理工）
○Shu SAITO, Izumi ORITA, Satoshi NAKAMURA, Toshiaki FUKUI (Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech)

【目的】

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は広範な微生物が貯蔵物質として菌体内に蓄積する生分解性ポリエステルである。代表的な PHA であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] は硬くて脆い物性を示すのに対し、ポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-*co*-3HHx)] 共重合体は C_6 ユニットを含むことで融点が低下し、柔軟性が向上した実用的な物性を示す。我々はこれまでに *Ralstonia eutropha* H16 株の P(3HB)生合成経路を改変し、植物油や糖質を単一炭素源として P(3HB-*co*-3HHx)生合成が可能な株を作製した。本研究では、*R. eutropha* における先行研究で確立した人工生合成経路を物質生産に汎用される *Escherichia coli* に導入し、糖質を基質とした効率的な P(3HB-*co*-3HHx)の生合成を目的とした。

【方法および結果】

PHA 非生産性である *E. coli* による PHA 生合成のため、アセチル-CoA から (*R*)-3HB-CoA を生成、重合する経路を JM109 株に導入した。この P(3HB)生産株に、*R. eutropha* での P(3HB-*co*-3HHx)生合成に有効であったブチリル-CoA 供給経路を導入、2%グルコースおよび 0.5 mM IPTG を添加した LB 培地で 48 時間振とう培養したところ、生合成された PHA から C_6 ユニットは検出されなかった。そこで、ブチリル-CoA に 1 分子のアセチル-CoA を付加し、次いで(*R*)-3HHx-CoA へと変換する *R. eutropha* 由来の 3 酵素をさらに導入した。最終的に外来 11 遺伝子を 3 種のプラスミドベクターで導入した形質転換体により、乾燥菌体重量あたり 41 wt%の P(3HB-*co*-11 mol% 3HHx)生合成を達成した。

導入した人工経路では、C_4・C_6 の(*R*)-3-ヒドロキシアシル-CoA は対応する 3-オキソアシル-CoA の(*R*)-特異的還元による生成と、(*S*)-特異的還元で生じた(*S*)-3-ヒドロキシアシル-CoA を経由した生成の両方の可能性が考慮された。しかし一部の遺伝子を欠失させたベクターを導入した株を用いた解析から、(*R*)-3HB-CoA はアセトアセチル-CoA の(*R*)-特異的還元、(*R*)-3HHx-CoA は 3-オキソヘキサノイル-CoA から(*S*)-3HHx-CoA を経由して供給されることを示した。

加えて、酢酸などの副産物生成経路の変異株や糖質代謝の亢進が報告されている中央代謝制御の変異株を *E. coli* 非必須遺伝子欠失変異株コレクション（Keio コレクション）より入手し、人工代謝経路を導入する宿主とすることで P(3HB-*co*-3HHx)生産の効率化を検討した。

polyhydroxyalkanoate, biodegradable plastic, artificial pathway

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3A10a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A10 会場

Methylobacterium extorquens の代謝改変によるメタノールを原料にしたポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成
Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* for production of polyhydroxyalkanoate copolymer from methanol
○折田 和泉、海野 源人、加藤 りさ、中村 聡、福居 俊昭（東工大院生命理工）
○Izumi ORITA, Gento UNNO, Risa KATO, Satoshi NAKAMURA, Toshiaki FUKUI (Sch. Life Sci. & Technol. Tokyo Tech.)

【目的】
安価かつ持続供給可能な次世代資源であるメタノールを単一炭素源として生育できるメタノール資化性微生物は、メタノールを原料にした有用物質生産菌として利用価値が高い。メタノール資化性菌のモデル微生物である *Methylobacterium extorquens* AM1 はメタノールを単一炭素源にして生育しながら貯蔵物質として生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）のポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]を蓄積する。P(3HB)は C_4ユニットのみからなるホモポリマーであり硬くて脆い物性を示すが、C_6ユニットが共重合すると柔軟性が向上することが知られている。本研究では、*M. extorquens* を宿主としメタノールを原料にして C_6ユニットが共重合した PHA 共重合体を効率的に生合成する菌株を代謝改変により育種することを目的とした。

【方法と結果】
本菌のメタノール代謝に必須の代謝経路であるエチルマロニル-CoA 経路（EMCP）上には C_5、C_6ユニットの前駆体であるプロピオニル-CoA とブチリル-CoA が存在する。そこでまず、PHA 重合酵素を広基質特異性の酵素遺伝子に置換した組換え株をメタノールを炭素源として培養した結果、重合酵素の置換のみで C_4、C_5、C_6ユニットが共重合したポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシ吉草酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸）[P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx)]三元共重合体を蓄積したが C_5、C_6ユニット分率は 1 mol%以下と低かった。つぎにプロピオニル-CoA とブチリル-CoA の供給量を強化するために EMCP を逆行させるエチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼを導入した結果、生育速度が顕著に低下し予想通り EMCP が逆行していることが推測されたが PHA 組成は変化せず PHA モノマー供給経路が律速になっている可能性が考えられた。そこで、モノマー合成経路として逆向きの β-酸化経路を構築した結果、生育速度がさらに低下したが C_5、C_6ユニット分率が数 mol%まで向上した。興味深いことに、このメタノール生育能の低下はメタノール酸化反応を強化することで改善することが明らかになった。しかし、いずれの条件においても定常期まで培養すると C_5、C_6ユニット分率が低下したことから、現在、逆向き β-酸化経路を構成する遺伝子を発現させるためのプロモーターを検討している。

methanol, methylotroph, polyhydroxyalkanoate

講演番号：3A10a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A10 会場

Xanthomonas campestris WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した ethyl α-D-glucopyranoside の高収量生産

High-yield production of ethyl α-D-glucopyranoside by α-glucosyl transfer enzyme of *Xanthomonas campestris* WU-9701

恩田 裕、○渡邉 理沙、中里 美穂、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
Yutaka ONDA, ○Risa WATANABE, Miho NAKAZATO, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

日本酒に約 4 g/L 含まれている ethyl α-D-glucopyranoside (α-EG) は、整肌作用や保湿作用を有するため化粧品素材としての用途がある。また、角質分化や繊維芽細胞の増殖を促進する効果が報告されている。しかし、酵素的合成法ではオリゴ糖などの副生があり、既往の方法では高収量の生産は困難であった。演者らは、*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来の α-グルコース転移酵素 (XgtA) について、酵素的諸性質を明らかにし、遺伝子クローニングと大腸菌における高発現にも成功している[1-3]。XgtA は α-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) に分類されるが、マルトースを糖供与体として、アルコール性 –OH 基やフェノール性 –OH 基にグルコースを転移し、マルトオリゴ糖などを副生することなく目的の α-グルコシドのみを選択的に合成することが可能である。本研究では、XgtA を使用した ethanol の α-グルコシル化によって、α-EG の選択的かつ高収量の生産を可能にした。

【方法および結果】

精製 XgtA を使用して、maltose を糖供与体、ethanol を糖受容体とした酵素反応による α-EG 生産の最適条件を検討した。maltose や glucose、生成物としての α-EG は HPLC により定量した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより酵素反応後の生成物を単離精製し、MS と NMR によって α-EG と同定した。反応条件の検討により、酵素量 1.25 U/mL、温度 45°C、pH 8.0、maltose 濃度 1.2 M、ethanol 濃度 0.8 M を最適条件と決定し、60 h、1-batch の反応で 42.1 g/L の α-EG 生産に成功した。一方、反応の進行にともない濃度が増加するグルコースにより転移反応の活性が低下することが見出された。そこで、他種の市販酵素を添加してグルコースの濃度を低下させることにより生産量増大を試みた。反応条件の最適化により α-EG 生産量は 1-batch で 61.2 g/L に達した。当該条件下で生産される配糖体は α-EG だけで、マルトオリゴ糖などの副生はなく、α-EG の選択的な高収量生産に成功した。

[1] H. Nakagawa *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 89, 138-144 (2000).
[2] J. Kurosu *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 93, 328-330 (2002).
[3] T. Sato *et al.*, J. Mol.Catal. B: Enzymatic, 80, 20-27 (2012).

Ethyl α-D-glucopyranoside, α-Glucosidase, *Xanthomonas campestris*

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：3A10p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A10 会場

Gluconobacter frateurii CHM43 耐熱化育種株における一遺伝子変異に基づく代謝変動を介した耐熱化機構

Single-gene mutation induce thermotolerance in thermally adapted *Gluconobacter frateurii* CHM43 via metabolic flux change

○松本 奈実[1]、服部 浩美[1]、松谷 峰之介[1]、外山 博英[2]、片岡 尚也[1,3]、藥師 寿治[1,3]、松下 一信[1,3]（[1]山口大院創成科学、[2]琉球大院農、[3]山口大中高温微セ）

○Nami MATSUMOTO[1], Hiromi HATTORI[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Hirohide TOYAMA[2], Naoya KATAOKA[1,3], Toshiharu YAKUSHI[1,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Univ. of Ryukyus, [3]Yamaguchi Univ. Research Center for Thermotolerant Microbial Resources)

【背景・目的】　大規模発酵では、菌の生育・発酵能力の保持のために発酵時の温度上昇を制御する冷却装置が必要となる。そのため、冷却コストやエネルギー削減に貢献できる耐熱性を有する菌株の開発とその耐熱化機構の解明が望まれている。酢酸菌は、食酢の醸造やビタミン C の前駆体となるソルボース発酵等に用いられる発酵細菌であるが、多大な発酵熱を生成する。先行研究により、ソルボース発酵株 *Gluconobacter frateurii* CHM43 を生育限界温度で育種することによって、より高温（38.5～40℃）で生育及びソルボース発酵可能な耐熱化株を取得した[1]。親株との比較ゲノム解析の結果、耐熱化株は、一塩基挿入によって 12 回膜貫通型の多剤耐性輸送体遺伝子がフレームシフト変異していることが明らかになった[2]。本研究では、この変異が耐熱化を導く細胞内代謝変動を引き起こすことを明らかにしたので報告する。

【方法・結果】　耐熱化株（多剤耐性輸送体欠損株）の機能解析の一環として親株と耐熱化株の細胞内外の代謝産物を HPLC により比較分析した。その結果、耐熱化株は培地トレハロース量の低下、細胞内トレハロースの蓄積が見られ、トランスポーター変異とトレハロース輸送及びその耐熱性との関連が示唆された。そこで、トレハロース合成遺伝子破壊株（Δ*otsAB* 株）を構築し、生育を比較した。予想と反して、Δ*otsAB* 株はトレハロースを全く合成できないのにも関わらず、耐熱化株よりも高温での生育能を有していた。この結果より、トレハロースの蓄積ではなく、その蓄積によって引き起こされるトレハロース合成を分岐点とする代謝変動が耐熱性に寄与していることが予想された。*G. frateurii* CHM43 は、主な糖代謝経路としてペントースリン酸経路（PPP）を使用しており、トレハロース蓄積もしくはその合成の遮断によって PPP への流れが増強して、NADPH 生成の増加が予想された。事実、変異株ではトレハロース生成の低下に伴って、酢酸が増加するとともに、NADPH/$NADP^+$比が大幅に上昇した。NADPH は細胞内で酸化ストレスの還元剤として機能していることから、各株の細胞内酸化ストレス（ROS）レベルを測定すると、NADPH/$NADP^+$比と負の相関関係を示した。これらの結果から、耐熱化株では、蓄積した細胞内トレハロースによりその合成を抑制することで、さらに、Δ*otsAB* 株では、トレハロース合成を完全に遮断することで、代謝フローを変動させ、NADPH 生成を促進し、ROS の減少を導き、耐熱性を増加したと結論した。

本研究は JST-ALCA 事業の一環として行われた。

[1] Hattori H, et al., *Appl Microbiol Biotechnol.*, **95**: 1531 (2012)
[2] 松本ら、*Gluconobacter frateurii* CHM43 の耐熱化に関する多剤耐性輸送体の機能解析、日本農芸化学会　2016 年度会（2016）

Gluconobacter, thermotolerant, pentose phosphate pathway

講演番号：3A10p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A10 会場

酢酸菌の $Na^+(K^+)/H^+$アンチポーター（NhaK2）は *Acetobacter pasteurianus* の耐熱性に寄与する
Effect of $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter(NhaK2) on thermotolerance in *Acetobacter pasteurianus*

○松下 一信[3,4]、末吉 里帆[1]、古川 藍子[1]、辰野 真木[1]、ソエンホール ビッチャイ[2]、松谷 峰之介[3]、松本 奈実[3]、片岡 尚也[3,4]、藥師 寿治[3,4]（[1]山口大農、[2]コンケン大、[3]山口大院創成科、[4]山口大中高温微セ）
○Kazunobu Matsushita[3,4], Riho Sueyoshi[1], Aiko Furukawa[1], Maki Tatsuno[1], Wichai Soemphol[2], Minenosuke Matsutani[3], Nami Matsumoto[3], Naoya Kataoka[3,4], Toshiharu Yakushi[3,4] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Khon Kaen Univ., [3]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [4]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】 酢酸菌は食酢醸造などに用いられる発酵細菌であるが，多大な発酵熱を発生するため，食酢醸造を始めとするその発酵生産はその温度維持のために多大なコストを必要とする。私達は，その問題を解決するために，耐熱性株や育種耐熱化株を用いる高温発酵系の開発を進めるとともに，これら菌株の耐熱性機構の解析も進めている[1)]。以前，耐熱性酢酸菌 *Acetobacter tropicalis* SKU1100 からトランスポゾン変異法を用いて多数の高温感受性株を取得し，その遺伝子解析に基づいて 24 の耐熱性遺伝子を明らかにした[2)]。その内の 1 つである putative Na^+/H^+ antiporter は，その後の研究で，中性 pH 域で Na^+だけでなく K^+イオンに依存した細胞内 pH 維持に寄与する新規な $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter (NhaK2)であること，そのホモログは酢酸菌全般を含む α–プロテオバクテリアに広く存在していることを明らかにした[3)]。一方で，近縁な *Acetobacter pasteurianus* 12 株で株間の系統関係と耐熱性との相関について解析したところ，特に近縁な日本の食酢由来の *A. pasteurianus* NBRC3279, 3283, 3284 の 3 株間については明確な耐熱性の違いが存在していた。これら 3 株のゲノム配列を相互比較したところ，それぞれ約数十カ所の塩基置換が存在することが見出された。これらのうち，耐熱性の弱い 2 株 NBRC3279 及び NBRC3284 株において、NhaK2 アンチポーターにアミノ酸の挿入および欠損領域が見出し，トランスポーター活性を調べたところ，両者でその活性が失われていることが明らかとなった[4)]。そこで，本研究では，野生型のアンチポーター遺伝子が変異型アンチポーターをもつ菌株の耐熱性を増強できるか否かを解析した。

【方法・結果】野生型の NhaK2 アンチポーターを有する *A. tropicalis* SKU1100 株および *A. pasteurianus* NBRC3283 株の *nhaK2* 遺伝子を有するプラスミド（pCM-FR および pCM83）を，接合伝達法を用いて，熱感受性で変異型 NhaK2 をもつ *A. pasteurianus* NBRC3284 株に導入しその耐熱性を解析した。

結果，(1) SKU1100 株 *nhaK2* 遺伝子（pCM-FR）を *A. pasteurianus* NBRC3283（野生型 *nhaK2* 株）と NBRC3284（変異型 *nhaK2* 株）へ導入したところ，NBRC3283 株には全く影響が見られなかったが，NBRC3284 株では高温下（39°C）において若干の生育促進が見られた。次に，(2) NBRC3283 株由来の野生型 *nhaK2* 遺伝子（pCM83）を同様に NBRC3284 株へ導入したところ，高温下（37, 39°C）での生育を促進した。一方，(3) NBRC3284 の生育は K^+の添加によって温度非依存的に抑制されるが，pCM-FR もしくは pCM83 の導入によって，この生育抑制は解除された。

これらの結果から，少なくとも *A. pasteurianus* NBRC3284 株では，NhaK2 アンチポーターによる K^+イオン輸送を介した pH 制御機能が回復すれば，高温下での生育が保証されることが示唆された。

1) Matsushita K et al., ***Biosci Biotechnol Biochem*, 80**, 655-668 (2016); 2) Soemphol W et al., ***Biosci Biotechnol Biochem.* 75,** 1921-1928 **(**2011); 3) Soemphol W et al., ***J Biotechnol.* 211**, 46-55 (2015); 4) 松谷ら，第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 (2016)

本研究は，JST-ALCA 事業の一環として行われた。

Acetic aicd bacteria, Thermotolerance, Na^+/H^+ antiporter

発表責任者：松下一信（kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A10p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A10 会場

酢酸菌の膜結合型アルデヒド脱水素酵素の分子種と発現：酢酸発酵との関連
Expression of different molecular species of membrane-bound aldehyde dehydrogenases in *Acetobacter pasteurianus*

福成 聖也[1]、松谷 峰之介[2]、○薬師 寿治[1,2,3]、片岡 尚也[1,2,3]、ガンジャナ ティーラグール[4]、松下 一信[1,2,3] ([1]山口大農、[2]山口大院創成科学、[3]山口大微研セ、[4]カセサート大)
Seiya FUKUNARI[1], Minenosuke MATSUTANI[2], ○ Toshiharu YAKUSHI[1,2,3], Naoya KATAOKA[1,2,3], Gunjana THEERAGOOL[4], Kazunobu MATSUSHITA[1,2,3] ([1]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [3]RCTMR Yamaguchi Univ., [4]Kasetsart Univ.)

【背景・目的】酢酸発酵において中心となる酢酸菌は，高いエタノール酸化能と酢酸耐性能を持つ。酢酸発酵は *Acetobacter* 属や *Komagataeibacter* 属酢酸菌によるエタノール酸化であり，細胞質膜に存在する２つの膜結合型酵素：アルコール脱水素酵素（ADH）とアルデヒド脱水素酵素（ALDH）によって触媒される連続的な酸化反応である。すなわち ADH によってエタノールがアセトアルデヒドに，ALDH によってアセトアルデヒドが酢酸に酸化される。ALDH は脱水素酵素サブユニット，チトクロムサブユニット，[Fe-S]クラスターサブユニットから構成され，ゲノム内で遺伝子クラスターにコードされる。これまでに私たちは，酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 に２種類の ALDH オペロン（*aldFGH*, *aldSLC*）が存在することを見いだし，逆遺伝学的解析から，酢酸発酵にはその両方の ALDH が必要であることを明らかにした。両酵素の基質に対する親和性が異なり，酢酸発酵条件と非発酵条件では２種類の ALDH が転写調節されていることもわかった。本研究では *A. pasteurianus* SKU1108 以外の酢酸菌が持つ ALDH ホモログを抽出し，酢酸発酵条件下におけるそれらの発現を調べた。
【方法・結果】*A. pasteurianus* ALDH の２つの脱水素サブユニット AldH と AldL をクエリに BLASTP による相同性検索を行うことで，既知の酢酸菌ゲノムが有する ALDH ホモログを抽出し，それらの系統関係を推定した。遺伝子近傍にチトクロムサブユニットと[Fe-S]クラスターサブユニットをコードする遺伝子が見当たらないものは除外した。対象とした 36 種のうち 35 種の酢酸菌ゲノムが AldFGH を持つことが明らかとなった。脱水素サブユニットの系統解析より，AldH にも AldL にも属さない２つの新規な遺伝子グループを見いだし，その相同性から暫定的に AldL2，AldY と名付けた。そこで ALDH 分子種のレパートリーが異なる 4 株（*A. pasteurianus*, *Acetobacter tropicalis*, *Komagataeibacter medellinensis*, *Komagataeibacter hansenii*）について，ALDH ホモログの発現を解析した。酢酸発酵はどの菌株でも行われ，菌株間でほとんど差がみられなかった。細胞膜を用いたアルデヒド酸化活性では，どの菌株においても酢酸発酵条件下に pH 5 よりも pH 4 の方が高活性であった。RT-PCR によって，酢酸発酵条件下で *aldFGH* の転写が増加することが示された。酢酸生産時には pH が低下するため，低 pH で働く AldFGH が主体になるという合理性が示唆された。一方，*aldSLC* の転写は酢酸発酵条件下では低下した。*aldSLC2* と *aldXYZ* の転写はほとんど変化がみられなかったが，転写されることは確認できた。他の酢酸菌においても，ほとんどの酢酸菌に保存されている AldFGH が酢酸発酵条件下で増強されることが明らかとなった。

acetic acid bacteria, acetic acid fermentation, aldehyde dehydrogenase

発表責任者：薬師寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A10p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A10 会場

酢酸菌の酸化発酵におけるシアン耐性呼吸鎖の役割
Role of cyanide-insensitive respiratory chain in oxidative fermentation of *Gluconobacter*
○三由 綾香、内藤 朋子、阿野 嘉孝 (愛媛大院農・生命機能)
○Ayaka MIYOSHI, Tomoko NAITO, Yoshitaka ANO (Grad. Sch. of Agr., Ehime Univ.)

【背景・目的】酢酸菌の酸化発酵は、物質生産に関わる細胞膜結合型酵素群が呼吸鎖初発脱水素酵素として機能し、基質からの電子が呼吸鎖末端酸化酵素を経由して最終電子受容体である分子状酸素へと受け渡されて進行する。*Gluconobacter* 属酢酸菌の呼吸鎖には、エネルギー生成に機能するシトクロム *bo_3* 型キノール酸化酵素 (BO_3)と、シアン耐性能をもちエネルギー生成能がないシアン耐性キノール酸化酵素 (CIO)が存在している。これまでにそれぞれの酵素が精製され、BO_3 がプロトンポンプ能をもちエネルギー生成に重要であることが示されている。一方、CIO は BO_3 より 10 倍以上も活性が高いことが示されているものの、その生理的機能については知見が不十分である [(1,2)]。本研究では、特に CIO に着目し、酸化発酵過程での役割を明らかにすることを目的とした。
【結果・考察】*G. oxydans* NBRC 12528 をジャーファーメンターで培養し、各生育期における末端酸化酵素活性を測定した。その結果、増殖期では BO_3 が、定常期では CIO が優勢的に機能していた。また、CIO 活性の異なる生育期の細胞で物質生産能を比較したところ、CIO 活性に依存して高い物質生産能を示した。このことから、CIO が優先的に機能している細胞で、高い酸化発酵能を示すことが示唆された。そこで、CIO 変異株を作製して様々な基質での生育を比較した。その結果、グルコースのみを炭素源とした時にΔCIO 株で顕著な生育の向上が見られ、CIO が生育を低下させる傾向にあることが示唆された。このときに培地 pH の著しい低下が見られるが、pH を一定に制御した生育環境では、その表現型が消失したことから、CIO は低 pH 環境下での電子伝達に重要な役割を担っていることが推測された。

(1) Matsushita K., et al., *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*. 304-312 (1987)
(2) Miura H., et al., *J. Biochem*. 535-545 (2013)

acetic acid bacteria, oxidative fermentation, respiratory chain

発表責任者：阿野　嘉孝（ano.yoshitaka.mf@ehime-u.ac.jp）

講演番号：3A10p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A10 会場

Acetobacter 属細菌で複製可能なプロモーター検索ベクターの開発

Construction of a promoter-probe vector for *Acetobacter* species

○中村 匡、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Takeru NAKAMURA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【目的】*Acetobacter aceti* はエタノールの不完全酸化により酢酸を生成し、これを高濃度に培地中に蓄積する能力を持ち、これは食酢醸造に利用されている。更にエタノールを全て消費した後、TCA 回路を用いて酢酸を消費する。この現象は酢酸過酸化と呼ばれ、食酢醸造において好ましくない。このように *A. aceti* は培養開始から順にエタノール酸化期、酢酸酸化期の二段階の生育を示す。

先行研究のマイクロアレイ解析により、炭素源としてエタノールが存在する場合、炭素源がグルコースである場合と比較して *A. aceti* の TCA 回路関連酵素遺伝子の転写量が低下することが示されている。また同様に、酢酸酸化期と比較して、エタノール酸化期において TCA 回路関連酵素遺伝子の転写量が低下することが示されている。しかし、エタノール酸化と酢酸酸化の代謝の切り替え機構については未だ明らかになっていない。

酢酸菌の遺伝子発現制御の解析にはこれまでマイクロアレイ、RNAseq、 定量 RT-PCR 等の手法が用いられているが、レポーター遺伝子を用いたプロモーター検索ベクターは利用されていなかった。そこで本研究では、酢酸菌における遺伝子発現制御機構の詳細な解析を行うためのツールとして、新規に酢酸菌で利用可能なプロモーター検索ベクターを開発することを目的とした。

【方法・結果】pUC18 タイプのカナマイシン耐性ベクターpHSG298 にまず Gluconacetobacter europaeus のプラスミド pGE1 の複製起点と予測される領域を組み込み、大腸菌とのシャトルベクターを作製した。このプラスミドにプロモーター活性測定用の領域を組み込んでプロモーター検索ベクターを作製し、これを pHSGE2 とした。このベクターを用いて、*A. aceti* の TCA 回路関連遺伝子のうち、citrate synthase をコードする遺伝子 *aarA*、succinyl-CoA:acetate CoA transferase をコードする遺伝子 *aarC* のプロモーター活性を測定した。異なる炭素源培地において *aarA*、*aarC* のプロモーター活性を測定したところ、エタノール存在時に活性が低下されることが確認された。また、生育段階による活性の差も確認できた。どちらも先行研究のマイクロアレイの結果と一致するものであり、*A. aceti* において作製したプロモーター検索ベクターが確かに機能することが示された。本発表では以上の結果に加え、このベクターを用いた他のプロモーター活性の解析の結果も合わせて報告する。

Acetobacter aceti, promoter-probe vector, acetate overoxidation

講演番号：3A10p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A10 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸代謝におけるメチルクエン酸経路およびピルベートフォスフェートジキナーゼの機能

Function of methylcitrate cycle and pyruvate phosphate dikinase during acetic acid metabolism in *Acetobacter pasteurianus*

○塚田 泰之[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、大西 直人[2]、傳寶 雄大[2]、吉田 将也[1]、兼崎 友[3]、福崎 英一郎[2]、貝沼（岡本） 章子[1] ([1]東京農大・応生科・醸造、[2]阪大院・工、[3]東京農大・ゲノムセ)
○ Yasuyuki TSUKADA[1], Morio ISHIKAWA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Naoto OHNISHI[2], Yudai DEMPO[2], Masaya YOSHIDA[1], Yu KANESAKI[3], Eiichiro FUKUSAKI[2], Akiko OKAMOTO-KAINUMA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* は、エタノール存在下（酢酸発酵条件下）で培養した場合、ピルベートホスフェートジキナーゼ（PPDK）を高発現する[1)]。本酵素はピルビン酸をホスホエノールピルビン酸（PEP）に変換し、解糖系の最終段階の逆反応を触媒するが、本菌における機能は不明である。我々は既に、代謝ターンオーバー解析（MTA）により、酢酸が主に TCA サイクルを経て代謝され、1）酢酸からピルビン酸を生成すること　2）酢酸は一部解糖系の逆行（糖新生）経路に入ること　3）酢酸よりアスパラギン酸やピリミジンヌクレオチドを迅速に生成することを報告しているが[2)]、一方で糖新生の際、オキサロ酢酸から PEP という経路を経ないという知見も得ている。PPDK は、上記通常の糖新生経路に代わり、ピルビン酸を PEP に変換することから始まる解糖系の逆行に寄与していることが推測されるが、酢酸からピルビン酸の生成経路が不明であり、PPDK の本菌生理における機能は未だ判明してない。本研究では、*ppdk* 破壊株についてトランスクリプトーム解析を行い、親株と比較することにより、本菌における酢酸の代謝および PPDK に関する新規の知見を得たので報告する。

【方法】 *A.pasteurianus* NBRC 3283 株を供試し、YPE 培地（Yeast extract 1%:Hipolipepton 1%:Ethanol 1%）中での振とう培養により培養を行った。*ppdk* 遺伝子破壊株の構築はカナマイシン耐性遺伝子カセットを用いた遺伝子置換法で行った。トランスクリプトーム解析は、Illumina Hiseq2500 を用いた RNA-seq 法で行った。

【結果および考察】*ppdk* 破壊株の挙動を親株と比較した結果、*ppdk* の破壊は酢酸代謝の遅延を引き起こした。両株について、酢酸代謝時の菌体内の全遺伝子発現量を調べた結果、親株においては TCA サイクルと並んでメチルクエン酸経路の構成因子が高発現するのに対し、*ppdk* 破壊株では、両経路とも構成因子の発現量が著しく低下した。このことから、本菌は酢酸代謝時にはメチルクエン酸経路が TCA サイクルと連動して活発に駆動し、これによりピルビン酸を供給することが示唆された。以上より、本菌において酢酸は、TCA サイクルを経てアスパラギン酸等の化合物を生成する一方、メチルクエン酸経路によりピルビン酸に変換され、PPDK はこれを PEP に変換して解糖系の逆行経路の駆動を促し、ピリミジンヌクレオチド等の種々の細胞構成成分の生成に関与していることが推測された。

1) 吉田将也ら 日本農芸化学会 2013 年度大会(2013) 2）大西直人ら 第 10 回メタボロームシンポジウム（2016 年）

pyruvate phosphate dikinase, methylcitrate cycle, *Acetobacter pasteurianus*

発表責任者：貝沼（岡本）章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：3A10p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A10 会場

Acetobacter 属酢酸菌の酢酸過酸化時における TCA サイクル周辺経路の機能解析
Functional analysis of TCA cycle relating pathways during acetate overoxidation in *Acetobacter* spp.

○佐々木 大樹[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、今井 健太郎[1]、山本 有紀[1]、松原 拓哉[1]、兼崎 友[2]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大・応生科・醸造、[2]東京農大・ゲノムセ)
○Daiki SASAKI[1], Morio ISHIKAWA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Kentaro IMAI[1], Yuki YAMAMOTO[1], Takuya MATSUBARA[1], Yu KANESAKI[2], Akiko OKAMOTO-KAINUMA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌は、酢酸生成を伴う酢酸発酵に続いて、生成した酢酸の消費を伴う酢酸過酸化という現象を示す。酢酸過酸化は菌体が酢酸を細胞内の TCA サイクルで完全酸化するために生じ、食酢醸造上好ましくない現象であるが、そのメカニズムの詳細については不明な点が多い。酢酸菌 *Acetobacter aceti* および *Acetobacter pasteurianus* は、いずれも伝統的な静置発酵による食酢醸造に用いられるが、過酸化速度に差異が観察され後者は前者に比べて穏やかな酢酸過酸化挙動を示す。両菌とも、関連が予想される TCA サイクル周辺因子として、共通してアセチル-CoA ヒドロラーゼ(AarC)及びアセチル-CoA シンターゼを保有しているが、それ以外の因子の構成には違いがあり、前者がグリオキシル酸経路(AceA-GlcB)を保有するのに対し、後者はアセテートキナーゼ(Ack)−ホスフェートアセチルトランスフェラーゼ(Pta)経路を有している。これらのうち、グリオキシル酸経路については、酢酸過酸化に関し、促進的に寄与することが既に報告されているが[1)]、今回はそれ以外の因子の寄与について網羅的に解析を行ったので報告する。
【方法】*A. pasteurianus* NBRC3283 株および *A. aceti* NRIC0242[T] 株を供試し、YPE 培地(Yeast extract 1%:Hipolypepton 1%:Ethanol 1%)を用いた振とう培養を行った。遺伝子の発現量解析は Illumina Hiseq2500 を用いた RNA-seq 法で行った。各遺伝子破壊株の構築はダブルクロスオーバーによる相同組み換えでカナマイシン耐性遺伝子カセットを挿入して行った。
【結果および考察】酢酸過酸化時、*A. aceti* においては、*aceA-glcB* の高発現・*aarC* の中発現・*acs* の低発現が観察され、*A. pasteurianus* においては *aarC* の高発現・*acs* および *ack-pta* の低発現が観察された。*aarC* の破壊は両株とも過酸化能の欠失を招いたのに対し、それ以外の因子の欠損は過酸化能の欠失を伴わず、*A. aceti* における *acs* の欠損は過酸化の遅延を引き起こし、*A. pasteurianus* における *ack-pta* の欠損は過酸化の促進を引き起こした(*acs* の欠損は影響なし)。以上のことより、本属における酢酸過酸化には AarC のみが必須であり、*A. aceti* の Acs およびグリオキシル酸経路は過酸化促進的に、また *A. pasteurianus* の Ack-Pta は過酸化抑制的に寄与すること、またこれらの遺伝子の発現量は必ずしも寄与度を反映しないことが示唆された。以上の知見は両株の過酸化挙動と良い一致を示し、*A. pasteurianus* が過酸化の側面から食酢醸造により適していることが推察された。

1)Sakurai *et al. J.Biosci. Bioeng.* 2013;115:32-36

TCA cycle relating pathway, *Acetobacter* spp., acetate overoxidation

発表責任者：貝沼(岡本) 章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：3A10p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A10 会場

Corynebacterium glutamicum 中央代謝酵素間におけるメタボロン形成の探索と解析
Study on metabolons in central metabolic enzymes of *Corynebacterium glutamicum*
○山﨑 史[1,2]、村井 恵一[1]、吉田 稔[3,4]、西山 真[1]、古園 さおり[1,3]([1]東大・生物工学セ、[2]協和発酵バイオ、[3]理研 CSRS、[4]東大院農生科)
○Fuhito YAMAZAKI[1,2], Keiichi MURAI[1], Minoru YOSHIDA[3,4], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,3] ([1]UTokyo-BRC, [2]Kyowa Hakko Bio Co., Ltd., [3]RIKEN-CSRS, [4]UTokyo-GSALS)

Corynebacterium glutamicum は、Tween 40 添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰生産する。グルタミン酸生産時にはグルタミン酸生産方向への大規模な代謝フラックスの増加が起こるが、それを担う代謝酵素の発現量は必ずしも上昇しておらず、酵素発現量に依存しない代謝調節機構の存在が示唆されている。本研究はメタボロンと呼ばれる代謝酵素複合体の形成が代謝フラックス変化に関わっている可能性を考え、*C. glutamicum* におけるメタボロンの探索とその制御機構の解明を目指した。

メタボロン探索のターゲットとして、解糖系から TCA サイクルへの導入部の反応を担う Citrate synthase (CS, NCgl0795)に着目した。CS と相互作用するタンパク質の探索には SPINE (Strep-tag Protein INteraction Experiment)(1)と呼ばれる手法を用いた。Strep タグ標識した CS をゲノム上で発現させ、タンパク質架橋を行ったあとアフィニティー精製を行い、精製画分を SDS-PAGE もしくは nano LC-MS/MS で解析を行った。抗 Strep タグ抗体をウェスタンブロット解析により、架橋処理により高分子側にシフトしたバンドが検出され、CS を含む複合体形成が認められた。MS 解析の結果、中央代謝系を含む代謝酵素が相互作用タンパク候補として検出され、CS を中心としたメタボロン形成の存在が示唆された。また、CS と CoA transferase (CoAT, NCgl2480)との相互作用が安定的に検出された。CoAT はアセチル CoA を生成する反応を触媒する酵素であり、アセチル CoA を基質とする CS と連続した反応経路を形成しうる。*C. glutamicum* で発現・精製した CS タンパクと CoAT タンパクを用いて *in vitro* プルダウンアッセイを行った結果、CS と CoAT の相互作用が検出された。また、異なるタグで標識した CS と CoAT の共発現株を用いた *in vivo* プルダウンアッセイでは、架橋処理がなくても CS と CoAT の共沈が観察された。これらの結果は CS と CoAT が *C. glutamicum* において強く相互作用していることを示唆しており、その生理的意義や相互作用機構に興味がもたれる。現在、CS を核としたメタボロン形成がグルタミン酸生産条件でどのように変化するかを検討中である。

1. C. Herzberg et al. Proteomics, 7(22), pp.4032-4035. (2007)

Corynebacterium glutamicum, metabolon, citrate synthase

発表責任者：山﨑史（y.fuhito.ac@gmail.com）

講演番号：3A10p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A10 会場

Corynebacterium glutamicum 由来 PDH-ODH 超複合体のサブユニット構造解析
Analysis of the PDH-ODH supercomplex from *Corynebacterium glutamicum*
○衣川 寛知[1]、小峰 理乃[1]、西山 真[1]、古園 さおり[1,2] ([1]東大生物工学セ、[2]理研 CSRS)
○Hirokazu KINUGAWA[1], Ayano KOMINE[1], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,2] ([1]UTokyo-BRC, [2]RIKEN-CSRS)

《背景》
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHc)及び 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(ODHc)は 3 つのサブユニット (E1、E2、E3)で構成される巨大な酵素複合体であり、凝集した E2 サブユニットをコアとしてその周囲に複数の E1・E3 サブユニットが結合している。グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産では PDH や ODH の活性調節が重要と言われており、これらの酵素はタンパク質翻訳後修飾のアセチル化やスクシニル化の基質の供給においても重要である。一般に、PDHc と ODHc は共通した E3 サブユニットを持ち、E1・E2 についてはそれぞれ固有のサブユニットを持つことが多い。しかし、*C. glutamicum* は E2 サブユニットをコードする遺伝子を 1 つしか持っておらず、PDHc と ODHc が E2 コアを介して超複合体を形成するユニークな特徴を持つ。我々は、超複合体におけるサブユニット組成が変化することで PDH や ODH の活性を調節するメカニズムの可能性を考え、未知の部分が多い PDH-ODH 超複合体の解析に着手した。
《方法》
PDH-ODH 超複合体サブユニットの検出のために、ODH-E1 サブユニット (E1o)をアフィニティータグで標識しゲノム上で発現させた株を作成した。BN-PAGE 及び超遠心分画を用いて複合体を分子サイズに従って分離し、SDS-PAGE とウェスタンブロッティングを用いて各サブユニットを検出した。また、グルタミン酸非生産条件・生産条件で各サブユニットの分布を比較した。
《結果》
タグ標識した株は野生株と同等の増殖とグルタミン酸生産能を維持していた。BN-PAGE 及び超遠心で分画したサンプルについて各サブユニットの分布を検出したところ、E1o サブユニットと PDH-E1 サブユニット (E1p)の分布に違いが見られ、E1o は E1p より高分子量の複合体に多く結合している傾向が見られた。また、E1o, E1p, E2 を含む超遠心画分の他に、E1o と E1p を含み E2 を含まない高分子量側の画分が見出され、E1o と E1p が未知のタンパクと相互作用している可能性が示唆された。現在、この画分に含まれるタンパク質の同定を試みている。今後は、ODHc の制御因子として知られる OdhI の影響や E2 のサブユニット結合ドメイン変異の影響を調べることにより、未知の部分が多い *C. glutamicum* の PDH-ODH 超複合体の性状と活性調節メカニズムを明らかにしたいと考えている。

Corynebacterium glutamicum, Pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase

発表責任者：衣川寛知（h-kinugawa-aa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A10p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A10 会場

Meiothermus ruber H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase (PDO)発現増強株の羽毛分解への影響

Effect of protein disulfide oxidoreductase produced by *Meiothermus ruber* H328 on feather degradation

○武田 梨花、西 海斗、渡部 邦彦（京府大院生命環境）
○Rika TAKEDA, Kaito NISHI, Kunihiko WATANABE (Kyoto Pref. Univ. Grad.)

【背景・目的】 好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株はケラチン分解性プロテアーゼを細胞外に分泌し、難分解性のトリ羽毛を強力に分解する。しかし、このケラチン分解性プロテアーゼ遺伝子欠損株で同様に培養を行った際に同程度のトリ羽毛分解が見られたため、他の酵素もトリ羽毛分解に関与していることが示唆された。そこで、トリ羽毛に多く含まれるケラチンの強固な構造の主因と考えられる disulfide 結合を酸化還元する可能性のある protein disulfide oxidoreductase (PDO) に着目した。H328 株のゲノムデータから PDO 候補遺伝子を探索し、選抜した *pdo7*, *10*, *18* それぞれの遺伝子破壊株を作製した。その中でも *pdo7* 遺伝子破壊株はトリ羽毛分解が抑制され、ケラチン分解活性も WT より 30%ほど低下したことから、分解に大きく関与する酵素であることが示唆された。本研究ではトリ羽毛分解の促進を目的として Pdo7 発現増強株を作製し、トリ羽毛分解への影響を調査し、分解メカニズムの解明を試みた。

【方法・結果】 *E. coli* のプロモーターコンセンサス配列をもとに解析する DNA 解析ソフトウェア GENETYX-MAC ver.10.1 に H328 株の全ゲノム配列*を供し、強力な転写プロモーター (-35, -10 領域) を探索した。最も強力なプロモーターとして、*mrh_1220* (*hypothetical protein*) のプロモーターを選抜した。*mrh_1220* の開始コドンより上流のプロモーター領域を含む 300 bp の配列を PCR で増幅させ、*pdo7* の開始コドン上流 525 bp に挿入したプラスミドを構築した。そして、相同組換えにより強力な転写プロモーターがゲノム上の *pdo7* 上流に組み込まれた *pdo7* 増強株を作製した。*pdo7* 増強株で培養を行ったところ、WT と比較して培養早期である 1 日目からトリ羽毛の顕著な分解が見られた。*pdo7* 増強株では disulfide 結合の還元、すなわち開裂が起こり、分解が促進されたと考えられた。トリ羽毛から抽出したケラチンを基質に 24 時間培養した菌体を用いて還元活性測定を行ったが、WT と同程度の活性しか示さなかった。以上のことから、24 時間以内に disulfide 結合が還元されるか、あるいは Pdo7 が disulfide 結合の開裂ではなく、タンパク質のフォールディングに関与しており、現段階では測定できていない他のプロテアーゼによる分解が関与する可能性が示唆された。現在、培養時間による disulfide 結合還元活性の変化の追跡や、培養上清以外のケラチン分解活性の解析を行っており、羽毛分解メカニズムにおける Pdo7 の寄与についてさらなる調査を行っている。

Genome Announc. 1:e00176–13 (2013)

protein disulfide oxidoreductase, keratin, thermophilic

講演番号：3A11a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A11 会場

発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を用いた芳香環を含むポリエステルの化学合成と生分解

Chemical synthesis and biodegradation of aromatic ring-containing polyester using fermented (*R*)-3-hydroxybutyric acid

○常盤 豊[1]、中山 敦好[1]、川崎 典起[1]、山野 尚子[1]、伊田 小百合[1]、楽 隆生[2]、世嘉良 宏斗[3]([1]産総研、[2]甲南化工、[3]沖縄県工技セ)
○Yutaka TOKIWA[1], Atsuyoshi NAKAYAMA[1], Norioki KAWASAKI[1], Naoko YAMANO[1], Sayuri IDA[1], Takao RAKU[2], Hiroto YOKARYO[3] ([1]AIST, [2]Konan Chemical Industry, [3]OITC)

【背景】最近、バイオマスを原料とした高分子素材の研究が盛んである。しかし、バイオマス由来の高分子素材であっても自然環境に適合するとは限らない。堆肥中で速やかに分解するプラスチックでも、海洋や土壌では分解が遅いものもある。高分子素材の分解特性を理解するためには、用途に応じた試験評価法と用語を使うことが重要との指摘もある[1)]。

微生物が作るポリ（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）は、海洋などの自然界でも分解しやすい生分解性プラスチックとして知られており、マイクロプラスチック問題を解決する一つの切り札として期待される。私たちは、*Halomonas* sp. OITC1261 株が菌体の外に生産する(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）を用いて、すでに、PHB およびそのポリウレタンをはじめ、ラセミ体の 3-ヒドロキシ酪酸やグリコール酸、L-乳酸などとの共重合体を化学合成して、その生分解性について解明してきた。今回、R3HB を用いて、ヒドロキシ安息香酸などの芳香環を持つ化合物との共重合体の化学合成を行い、それらの特性と生分解性について検討した。

【方法】光学純度 99%ee の発酵 R3HB を使用した。ポリエステルの合成は *p*-トルエンスルホン酸を触媒に用いて、R3HB と種々の芳香族化合物をトルエン中で脱水重合することにより行った。化学合成したポリエステルの生分解性は、好熱性の *Streptomyces* sp. MG 株が生産する PHB 分解酵素[2)] よる分解試験と BOD テスター200F を用いて海水により評価した。

【結果】R3HB を用いて、2-ヒドロキシ安息香酸（2HBA）、3-ヒドロキシ安息香酸（3HBA）および 4-ヒドロキシ安息香酸（4HBA）をモル仕込み比 90:10 で共重合させた場合、R3HB:2HBA、R3HB:3HBA および R3HB:4HBA のモル比がそれぞれ 99.6: 0.4 (*M*w 8410)、97.4: 2.6 (*M*w 6390)、98.4: 1.6 (*M*w 6210,) の共重合体が得られた。PHB 分解酵素による 50℃、3 時間の共重合体の分解は、R3HB ホモポリマー (*M*w 7240) の 50.3%に比較して、19.8～29.3%に低下した。さらに、海水における分解性についても報告する。

1) A.-C. Albertsson, M. Hakkarainen, *Science* **358,** 872 (2017)
2) B.P. Calabia, Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett*. **28**, 383-388 (2006)

(*R*)-3-hydroxybutyric acid, polyester, biodegradation

発表責任者：常盤　豊（y.tokiwa@aist.go.jp）

講演番号：3A11a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A11 会場

脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解 (II)

Biodegradation of aliphatic polyesters in sea water (II)

○中山 敦好、川崎 典起、山野 尚子 (産総研)
○Atsuyoshi NAKAYAMA, Norioki KAWASAKI, Naoko YAMANO (AIST)

【目的】生分解プラスチックの海水中での分解については不明な点が多く、プラスチック廃棄物による海洋汚染の解決策とするには慎重な意見も多く、海水中での生分解挙動について一層の知見の蓄積が必要である。我々は以前、生合成系及び化学合成系脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解について、潮の満ち引き、季節、塩濃度、海水温・試験温度、同一湾内での採水場所の違いなどの因子について報告した[1)]。本発表では、採取場所の違いによる海水の生分解活性について報告する。

【方法】生分解性試験は各地で採取した表層海水を用いて、タイテック社製 BOD 測定装置にて行った。主として PHB 粉末を用い、適宜他の生分解性樹脂も用いた。樹脂試料を添加し、一定温度下、撹拌を続け、生分解によって消費される酸素量をモニターして評価した。海洋深層水は沖縄県海洋深層水研究所のものを使用した。

【結果】大阪湾内の複数箇所から採水した海水では河口位置や潮の干満の影響は大きくなかったが、都市部と郊外とで海水の生分解活性に差が認められた。そこで対象地域を広げて、東京、福井、沖縄の各地域の海水についても検討したところ、大阪湾と同様に都市域において生分解活性が高いという結果が得られた。その原因の一つとして海水中の微生物数が考えられた。また、数ｋｍ以内の狭い域内で護岸壁、砂浜、400m 沖合（海釣り公園内）の海水を比較したところ、大きな差異は認められず、基本的に域内の海水は均一化されていると考えられる。試験は撹拌して行っているが、撹拌を停止させて行ったところ、撹拌時よりも生分解の進行は遅く、その影響は生合成系樹脂よりも化学合成系樹脂の方が大きかった。無撹拌による生分解の抑制は海水中の溶存酸素量の低下が原因の一つと考えられる。海水は主として表層海水を用いたが、海面下 5m の海水も採取し、試験に供したところ、試験開始直後は、水深 5mの海水において生分解はより速く進行し、時間とともにその関係は逆転し、4 週間後には表層海水の方が生分解率は高くなるが、その差はそれほど大きくなかった。海水中の微生物数は表層水の方が多いのに初期において生分解が逆転するのは、水深 5mの海水では本来溶存酸素が少ない環境から BOD 装置という酸素リッチな環境に変化したため一時的に微生物活動が活発化したためと考えている。取水水深 612m の海洋深層水を用いた生分解性試験も検討したので合わせ報告する。

1） 日本農芸化学会 2016 年度大会 2A001

Biodegradation, Microplastic, Sea water

発表責任者：中山敦好（a.nakayama@aist.go.jp）

講演番号：3A11a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A11 会場

海水によるポリアミド 4 分解
Biodegradation of polyamide 4 in seawater

○山野 尚子、川崎 典起、中山 敦好（産総研）
○Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama (AIST)

【目的】

γ-アミノ酪酸(GABA)の重合体であるポリアミド 4 (PA4)はナイロンの一種であり、バイオマスから生産した GABA を原料として生産可能なバイオベースポリマーである [1)]。またナイロンであるが環境中や生体内で生分解される性質を持つ生分解性ポリマーである [2,3)]。我々は活性汚泥から PA4 分解菌を単離し、分解菌が加水分解により PA4 を分解することを報告している。一方近年、環境中特に海洋でのマイクロプラスチックが問題となっており、海洋中で容易に生分解されるプラスチックはその問題を解決する一つの手段と考えられる。そこで PA4 の海水による生分解について検討し分解に関与する分解菌の単離を試みた。

【方法】

・ポリマー試料の調製：PA4 は 2-ピロリドンを原料として開環重合により合成した。フィルムは溶媒キャスト法により、不織布は電界紡糸により作成した。・生分解試験（BOD 試験）：JIS K6950 を参考に、BOD 測定装置（タイテック, BOD tester 200F）を用いて、活性汚泥では無く海水を使用して試験を行いポリマーの生分解に伴う酸素消費量を測定することにより分解を評価した。・海水浸漬試験：試料（フィルム、不織布）を海水中に浸漬後一定時間毎に試料を回収し、形状変化を観察、重量変化を測定した。・分解菌の単離：BOD 測定装置を用いた生分解試験での試験液を PA4 を含むマリンブロス寒天培地に塗布、ハローを生じるコロニーを単離した。

【結果】

PA4 は実験室内での生分解試験の結果、活性汚泥と同様に海水でも容易に生分解された。また実環境での海水浸漬試験においても生分解された。各種官能基を導入した PA4 は活性汚泥での生分解が抑制されるが、この抑制効果は海水での生分解でも同様の結果が得られた。海水での分解試験液から単離した分解菌は粉末状の PA4 を分解した。さらにこの分解菌による PA4 分解の分解生成物の解析および官能基を持つ PA4 に対する生分解について検討した。

1) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,21,528(2013)
2) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,16,141(2008)
3) Yamano *et al,* Polym.Degrad.Stab.,137,281(2017)

biodegradable polymer, polyamide

発表責任者：山野尚子（yamano.naoko@aist.go.jp）

講演番号：3A11a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A11 会場

Bacillus megaterium 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる 2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル（CB118）の代謝とその構造基盤

Structural basis of CB118 metabolism by cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium*

後藤 絵里香[1]、羽賀 雄紀[2]、久保 淳[3]、伊藤 俊将[3]、笠井 千枝[4]、荘司 長三[4]、山本 恵子[3]、松村 千里[2]、中野 武[5]、○乾 秀之[1,6]（[1]神戸大院農、[2]兵庫県環境研セ、[3]昭和薬科大院、[4]名古屋大院理、[5]大阪大環境安全研究管理セ、[6]神戸大バイオ）

Erika GOTO[1], Yuki HAGA[2], Makoto KUBO[3], Toshimasa ITOH[3], Chie KASAI[4], Osami SHOJI[4], Keiko YAMAMOTO[3], Chisato MATSUMURA[2], Takeshi NAKANO[5], ○Hideyuki INUI[1,6] ([1]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Hyogo Pref. Inst. of Env. Sci., [3]Showa Pharm. Univ., [4]Nagoya Univ., [5]Osaka Univ., [6]Biosignal. Res. Cent., Kobe Univ.)

【背景】ダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル（DL-PCB）は環境中に広く残留しており、食物連鎖による生体への蓄積とその毒性が深刻な問題となっている。DL-PCB の中でも 2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル（CB118）は大気、水質、底質、生物から最も多く検出されている。シトクロム P450（P450）モノオキシゲナーゼである土壌細菌 *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 は、長鎖脂肪酸の亜末端部位を水酸化する酵素であり、既知の P450 の中で最も反応速度が高いと言われている。しかし、これまでに P450BM3 による DL-PCB の水酸化に関する報告はない。そこで本研究では、PCB のバイオレメディエーションを目標とし、P450BM3 野生型（WT）による CB118 の代謝を試みた。さらに、様々な P450BM3 変異体を構築することにより、CB118 代謝活性の向上を試みた。

【方法】部位特異的変異 PCR により、4 種の P450BM3 変異体を構築した。精製した WT 並びに各変異体の組換えタンパク質と、炭素鎖の異なるペルフルオロカルボン酸（PFCAs）を用いて、CB118 と 37℃で 3 時間反応させた。PFCAs は P450BM3 と結合し、本来基質ではない化合物に酸化反応を引き起こす化合物（デコイ分子）として知られている。ヘキサンにより代謝物を抽出し、硫酸ジメチルにより誘導体化後、高分解能ガスクロマトグラフィー／高分解能マススペクトロメトリーに供し、代謝物の同定と定量を行った。さらに SYBYL-X2.1 の Surflex Dock プログラムを用いて CB118 や PFCA に対するドッキングモデルを構築した。

【結果と考察】WT により、CB118 は 4 種の 5 塩素水酸化物（M2-M5）に代謝された。この代謝反応は、炭素鎖が 6 から 9 の PFCA の添加によって促進され、中でも PFCA-C8 を用いた際に、代謝物の生成速度が最も高くなった。一方、変異体による CB118 の代謝では、WT による 4 種の代謝物に加えて新たな代謝物 M1 が検出された。ある種の変異体において、CB118 代謝物生成速度は、WT と比較して著しく高かった。また、WT と同様に PFCA 依存的な代謝活性を示す変異体だけでなく、PFCA 非依存的な代謝活性を示す変異体もあった。その活性は WT による PFCA-C8 添加時と同程度であった。ドッキングモデルにより、変異の導入による基質結合部位の大きさや形状の変化が、CB118 代謝活性や代謝物選択性、PFCA の役割の変化に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。本研究により、PCB の環境動態を明らかにでき、さらに、PCB のバイオレメディエーションに応用するための重要な知見が得られると考えられる。

cytochrome P450 monooxygenase, polychlorinated biphenyl, perfluorocarboxylic acid

発表責任者：乾秀之（hinui@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A11a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A11 会場

Rhodococcus jostii RHA1 における β-ケトアジピン酸経路から分岐する新規異化経路
A novel catabolic pathway branching from the β-ketoadipate pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1

○戸塚 直希[1]、増田 恵実[1]、山梨 智也[1]、長谷部 文人[1]、原 啓文[2]、鮒 信学[1] ([1]静県大食栄、[2]マレーシア工科大マ日国際工科環境)
○Naoki TOTSUKA[1], Megumi MASUDA[1], Tomoya YAMANASHI[1], Fumihito HASEBE[1], Hirofumi HARA[2], Nobutaka FUNA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Universiti Teknologi Malaysia, MJIIT)

【目的】

土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 はβ-ケトアジピン酸経路により芳香族化合物を異化し、acetyl-CoA、succinyl-CoA に分解する。そのため、*R. jostii* RHA1 は、芳香族化合物を唯一の炭素源として生育することができる。CatABC はβ-ケトアジピン酸経路の酵素であり、CatA は catechol を muconate（**1**）に、CatB は **1** を(*S*)-muconolactone（**2**）に、CatC は **2** をβ-ketoadipate enol-lactone (**3**)にそれぞれ変換する。Δ*catC* 株は **2→3** が遮断されているため **2** を蓄積するが、我々は以前、Δ*catC* 株が一度蓄積した **2** を消費するという現象を見出している。本研究では、**2** から分岐する新規異化経路の発見、また、それを担う酵素遺伝子を探索した。

【方法・結果】

R. jostii RHA1 親株およびΔ*catC* 株、Δ*catB* 株を、炭素源に benzoate（benzoate→→catechol→**1**→**2**→**3** の順に異化される）を用いた最小培地にて培養した。その結果、親株は培養 2 日目に生育したが、Δ*catB* 株は **1→2** が遮断されているため、10 日目においても生育しなかった。 一方、驚くべきことに、 Δ*catC* 株は培養 8 日目に生育が確認できた。また、Δ*catC* 株の培養上清を LC-MS で分析した結果、培養 7 日目まで上清に存在していた **2** が、8 日目以降に減少することが判明した。以上より、**2** から分岐する新規異化経路が存在し、Δ*catC* 株においてその経路が誘導されたことが示唆された。

我々は、Δ*catC* 株の培養上清を LC-MS 分析し、**2** の異化物を探索した。その結果、**2** の加水分解により生じたと考えられる化合物が検出された。そこで我々は、分岐経路の初発反応は、**2** の加水分解であると予想し、その候補遺伝子を探索した。上記のように、Δ*catC* 株の誘導期は非常に長いが、分岐経路に関与する候補遺伝子を強制発現させると、Δ*catC* 株の誘導期は短くなると考えられる。そこで、7 種の候補遺伝子を選抜し、それぞれをΔ*catC* 株に導入し、benzoate 培地にて生育させた。その結果、候補遺伝子 A は顕著にΔ*catC* 株の誘導期を短縮した。本実験結果およびその相同性より、候補遺伝子 A がコードする酵素が新規異化経路に関与すると予想している。現在、候補遺伝子 A の遺伝子破壊株を取得中であり、Δ*catC* との二重破壊株の benzoate 培地における生育を試験する予定である。

Rhodococcus, benzoate catabolism, β-ketoadiapte pathway

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A11a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A11 会場

フィンランド・ラップランドのパルサ崩壊地の泥炭から高 N_2O 放出細菌株の分離，それらの挙動および脱窒遺伝子の解析

Isolation of hyper-active N_2O emitting bacteria and analyses of their physiological characteristics and denitrification genes

○阿知和 菜子[1]、ヤンシャ ニェ[1]、ターバナイネン テームー[2]、橋床 泰之[1] ([1]北大院農、[2]東フィンランド大)
○Nako ACHIWA[1], Nie YANXIA[1], Teemu TAHVANAINEN[2], Yasuyuki HASHIDOKO[1] ([1]Hokkaido Univ. Graduate School of Agriculture, [2]University of East Finland)

【目的】亜酸化炭素(N_2O)は CO_2 の 310 倍の温室効果を持ち、半減期は 114 年にもなる安定な温室効果ガスであり、脱窒、硝化、あるいは異化的硝酸塩還元（DNRA）経路で生成される。北方泥炭のうち、永久凍土融解によるパルサ崩壊地を含めた高緯度ツンドラ帯の攪乱泥炭地は，しばしば強力な N_2O 放出ホットスポットになることが知られている。北方泥炭を形成するミズゴケ類に着生する微生物群集は、窒素循環、特に窒素固定から硝化を経て脱窒までのサイクルすべてに深く関わっているため、その理解が N_2O 放出抑制につながると期待されている。本研究では、温暖化で大きな攪乱を受け、地盤沈降を伴うパルサ湿原崩壊地のミズゴケ類や泥炭土壌から N_2O 放出細菌の探索を行い、それらの微生物生理学的特徴と泥炭土壌の物理化学的性状との関連について調べた。
【方法】フィンランド･キルピスヤビ南部のパルサ湿原地盤沈降崩壊地 3 カ所の計 14 地点から採取したミズゴケから、その組織片（1 cm 長）をランダムに採り、5 mM KNO_3 の WG (Winogradsky's-ジェランガムソフトゲル+スクロース 0.5 %) 培地に接種した。高い N_2O 放出を示した培養物は、これを滅菌水で 1000 倍希釈後 MWG (0.005% yeast extract 添加 WG) 平板に広げ、出現した単コロニーを分離した。得られた菌株 20 株をそれぞれ単独で N_2O 放出試験にかけ、N_2O 高放出株を検索した。生成 N_2O 量は ECD-ガスクロマトグラフィーで定量し、高 N_2O 放出細菌と判断したものは、16S rRNA 遺伝子配列で同定し、脱窒経路および DNRA 経路関連遺伝子群について検出を試みた。また、KNO_3 以外の 5 mM N 源（KNO_2, $(NH_4)_2SO_4$）を WG 培地に添加し、それぞれ N_2O 生成量を測定した。
【結果および考察】ミズゴケ組織片を直接接種した培地からの N_2O 放出検定では、3 カ所のサイトから採取した計 14 点のサンプル中 6 サンプルで高 N_2O 放出が認められ、Peera (N68° 53' E21° 03')の plot1 (パルサボッグ沈降後、池塘中心部の乾燥が進行した泥炭) の培養物から高 N_2O 放出能を示す細菌を単コロニーとして得た。16S rRNA 遺伝子配列から、これがベータプロテオバクテリア綱 *Serratia* 属およびアルファプロテオバクテリア綱 *Rhizobium* 属の混合物と判明したため，再度純粋分離操作に供試し、それぞれを 10 株ずつ単離した。それぞれの分離細菌株について、両者とも N 源を $(NH_4)_2SO_4$ とすると N_2O は放出せず、KNO_3 よりも KNO_2 を効率的に N_2O 生成の基質として利用できることが分かった。*Sellatia* 属は *narG*, *nirK* を有していたが、*Rhizobium* 属はこれら脱窒関連遺伝子を保持しておらず、アセチレン阻害試験では両者とも N_2O 放出量の増加を示さなかった。この結果から、少なくとも *Rhizobium* 属分離株は脱窒経路ではなく DNRA 経路で N_2O を放出すると考えられた。

disrupted palsa mire, hyper-active N_2O emitter, *Rhizobium* sp.

講演番号：3A11a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A11 会場

ヒ素高蓄積植物モエジマシダ根圏からの亜ヒ酸酸化細菌の単離と解析

Isolation and characterization of an arsenite oxidizing bacterium in the rhizosphere of arsenic hyper accumulator *Pteris vittata*

○宮内 啓介、森 秀成、阿部 凌平、堀内 孝人、遠藤 銀朗（東北学院大工）
○Keisuke MIYAUCHI, Hidenari MORI, Ryohei ABE, Takato HORIUCHI, Ginro ENDO (Tohoku Gakuin Univ.)

【背景】ヒ素高蓄積植物であるモエジマシダは、ヒ酸を根から取り込むことが知られている。亜ヒ酸は根圏でヒ酸に変換されてから取り込まれるが、この亜ヒ酸酸化には根圏に存在する細菌群が関与していると考えられている。そこで、本研究では、モエジマシダ根圏から亜ヒ酸酸化細菌を単離し、亜ヒ酸酸化に関与する遺伝子群について解析を行った。
【材料と方法】細菌の単離源として、水耕栽培したモエジマシダの根を用いた。単離した細菌の亜ヒ酸酸化活性を測定するため、亜ヒ酸 1μM を含む LB 培地に前培養した細菌を植菌し、4 日間培養した。培養上清中のヒ素のうち、ヒ酸をヒ酸分離カラムを用いて除去し、亜ヒ酸濃度を測定した。カラムを通さないサンプルも測定し、全ヒ素濃度とした。酸化細菌単離時のヒ素濃度の測定には原子吸光光度計を用いた。
【結果】水耕栽培したモエジマシダの根を破砕し、得られた液体を LB 培地に塗布して、30℃で培養した。生育したコロニーの亜ヒ酸酸化活性を原子吸光光度計を用いて測定した。その結果、亜ヒ酸酸化活性を示す菌を 1 種類単離することに成功した。16S rRNA 遺伝子配列より、この細菌が *Pandoraea* 属の細菌であることが明らかになったため、本細菌を *Pandoraea* sp. NE5 株と命名した。次に、NE5 株において亜ヒ酸酸化に関わる遺伝子群の同定を試みた。まず、NE5 株のトランスポゾンライブラリーを作製した。ゲノム中にトランスポゾンがランダムに挿入されていることを確認した後、約 3000 コロニーを亜ヒ酸存在下でマイクロプレートを用いて培養した。培養液中の亜ヒ酸の有無を、当研究室で作製した亜ヒ酸に反応して発光するレポーター細菌を用いて測定した。選抜した株については再度同様の実験を行い、亜ヒ酸酸化能が低くなった株を同定した。得られた株のトランスポゾン挿入部位を同定した結果、molybdenum ABC transporter ATP-binding protein や金属応答転写制御因子に隣接する hypothetical protein に相同性を示す遺伝子等が同定された。現在、引き続きスクリーニングを行うと共に、上記遺伝子群の亜ヒ酸酸化への関与について解析を行っている。

arsenic, arsenite oxidizing bacteria, *Pteris vittata*

発表責任者：宮内啓介（kmiya@mail.tohoku-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A11a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A11 会場

鉄鋼スラグから鉄溶出を促進する微生物の探索と同定

Identification of bacterial species that accelerate iron elution from steel slag

○月舘 秀典[1]、吉村 航[2]、永田 宏次[1]、吉村 悦郎[3]、鈴木 道生[1]([1]東京大農、[2]新日鐵住金株式会社、[3]放送大)
○Hidenori TSUKIDATE[1], Koh YOSHIMURA[2], Koji NAGATA[1], Etsuro YOSHIMURA[3], Michio SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NIPPON STEEL & SUMITOMO METAL CORPORATION, [3]The Open University of Japan)

【背景・目的】近年、海洋環境の変化に伴い沿岸域では大型藻類が消失する「磯焼け」という現象が報告され、漁業への深刻な影響が問題になっている。一方、鉄鋼業界では鉄鋼を生産する際にできる副産物である鉄鋼スラグをその化学的性質をより有効に利用した付加価値の高い新規活用法が模索されている。近年、鉄鋼スラグを大型藻類の鉄分供給源として活用する方法を開発しようと、海洋における鉄鋼スラグの浸漬実験などが進められてきた。海水中で鉄鋼スラグから鉄分などが溶出することや鉄鋼スラグの周囲に藻場が形成されることなどが、これまでの研究から明らかとなってきたが、地域差や時期の差が大きく安定しない結果となっていた。この不安定さは鉄鋼スラグ表面における地域や時期などによる微生物相などの違いが鉄の溶出に影響を与えているのではないかと思われた。そこで、鉄鋼スラグ表面に微生物を付着させることにより、より安定的に鉄の溶出を行い、藻場の育成が可能な鉄鋼スラグを開発することを目的とした。
【方法】まず、鉄鋼スラグに作用し、鉄イオンを多く溶出させる微生物の探索を行った。東京湾の海水、石・コンクリートを持ち帰り、そこに含まれている細菌を単離培養した。次に、鉄鋼スラグ 3 g に対し鉄イオンを含まない液体培地 10 mL を入れたチューブにこれらの細菌を 1 種ずつ白金耳で植菌し、3 日または 4 日間 25℃で振盪培養した。培養終了後、培養液から固体成分を取り除き、含まれる鉄の濃度をルミノールによる化学発光、および ICP-AES で定量した。
　次に、鉄溶出能が高かった細菌について、鉄イオンと安定な錯体を形成する分子の探索を行った。鉄イオンを含む液体培地中で鉄鋼スラグを入れずに細菌を 1 日培養し、固体成分を取り除いた培養液をポストカラム鉄キレーター分析法で分析し、化学種の分離と鉄イオンの有無を同時に調べた。
【結果・考察】鉄鋼スラグに細菌を植菌しない場合と比べて、海水への鉄溶出濃度が高かった細菌が 3 種見つかった。これらの細菌を大量培養し鉄鋼スラグとの相互作用を解析し、より効率的に鉄溶出を行う条件の検討を行っている。さらに、それらの細菌の細胞外代謝物を HPLC で分析すると分子量 100～500 の低分子領域に鉄イオンの存在を示す鋭く高いピークが複数見られた。このことから、これらの細菌は鉄イオンと錯体を形成する分子を生産することが示唆された。現在これらの分子を同定する作業を進めている。

steel slag, iron supply, bacterial secretion

講演番号：3A11a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A11 会場

海洋環境における生分解性プラスチック PHBH 分解菌の探索とその分解能

Isolation of biodegradable plastic PHBH degrading bacteria and its ability for the degradation.

○能木 裕一[1,2]、本間 絢[1,2]、加藤 千明[3] ([1]海洋研究開発機構・深海バイオ、[2]横浜市大・生命ナノ、[3]海洋研究開発機構・多様性)
○ Yuichi NOGI[1,2], Aya Honma[1,2], Chiaki Kato[3] ([1]JAMSTEC MBE, [2]Yokohama City Univ., [3]JAMSTEC BIO-DIV)

【背景・目的】急速な石油製品の開発と利用、各種のプラスチック素材の開発は、我々の生活を便利に快適にしてくれた反面、その難分解性の性質が、我々の環境にとって深刻な影響をもたらし始めてきた。大量に排出されたプラスチックごみ（以下、プラごみ）が、自然界の生態系により分解されずに半永久的に残るため、こうしたプラごみを餌と間違えて食べた鳥や、海獣類、魚などが死んでしまう、さらには、海岸などに漂着したプラごみが太陽光の紫外線により細分化され、マイクロプラスチック（MP）化してしまい、各種の有害化学物質（ＰＣＢ、ダイオキシン類、塩素系農薬など）が MP に吸着して、それを食べた生物の体内に蓄積してしまうといった報告がなされている。近年の深海調査で、我が国周辺の深海底にも分解されずに残っているプラごみが多く蓄積されていることが、発見され続けている。こうした事実は、将来的には我々の健康と生命に危機をもたらす可能性があり、国連でも今後 15 年間で達成するための目標として「Sustainable Development Goals」を 17 項目提唱し、海洋環境に流れたプラごみ問題の解決も含まれている。環境汚染の問題は古くから指摘されており、各種の生分解性プラスチックが開発･利用されてきた。しかし、それらの素材の生分解試験はいずれも陸上環境条件でだけなされ、高圧、低温下の海洋環境での分解性は想定されていない。また、何らかの前処理を行わないと多くの素材はほとんど分解されない。我々の深海環境を再現した分解試験では、1 部の生プラ素材を除いて生分解性が確認できいない。我々は海洋環境に流出しても微生物により分解される素材とその分解菌の探索を目的とした。
【方法・結果】新規に開発された生プラ素材、Poly-3-hydroxybutylate-3-hydroxyhexanoate（カネカ生分解性ポリマーPHBH™)を材料に浅海から深度 4,000m までの各種サンプルから分解菌のスクリーニングを行った。菌の分離は集積培養と PHBH パウダーの分解に因るクリアゾーンを指標に行った。その結果、16S rRNA 解析から PHBH 分解菌は広範囲の属に存在し、低温から中高温での分解が認められた。その中から特に分解活性の高い 4 株を選び、高圧･低温の深海環境での生育や、海洋環境での PHBH フィルムの分解能などを試験した。これらの試験結果から、PHBH は深海を含む、地球環境に優しい生分解性素材であり、前処理を行う事無しに多くの菌が分解を行った。

PHBH, biodegradable plastic, Marine bacteria

発表責任者：能木　裕一（nogiy@jamstec.go.jp）

講演番号：3A11a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A11 会場

Biotransformation of phenolic compounds by Bacillus licheniformis strain TAB7

○Enock Mpofu[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1], Felipe Vejararo[1], Joydeep Chakraborty[1], Toshiaki Kimura[2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyota Motor Corp.)

[Objectives] *Bacillus licheniformis* strain TAB7 is a facultative anaerobic thermophile, originally isolated as a Tween 20 degrader from manure compost in Hyogo prefecture, Japan[1)]. It was shown to degrade short chain fatty acids such as valeric, butyric, propionic and related acids responsible for the offensive odor in manure. Compost deodorized using strain TAB7 resulted in better germination and growth of Komatsuna vegetables compared to un-deodorized compost, leading to interest in the ability of TAB7 to degrade or transform some plant germination and growth inhibitors which could be found in compost. A wide number of lignin-related phenolic compounds and natural constituents of plant cell walls are found in considerable amounts in manure and have been shown to have negative allelopathy on germination and growth of some plants. We previously reported the ability of strain TAB7 to transform ferulic, vanillic and protocatechuic acids. We have now been able to identify some transformation products and intermediates in the biotransformation of ferulic, caffeic and vanillic acids. We have also determined TAB7's ability to transform further phenolic compounds.

[Method] Strain TAB7 grown overnight in LB media was washed three times with carbon-free buffer and suspended in 2 mL of the same buffer. 0.2 mg/L of each phenolic acid was added separately and incubated at 30 ˚C under shaking conditions for 24 h. Samples were centrifuged, filtered and analyzed by HPLC equipped with diode-array detector (DAD). Fractions of intermediate/product peaks were collected and analyzed by HPLC-MS/MS.

[Results] Strain TAB7 decarboxylated ferulic acid to 4-vinylguaiacol which accumulated in the media, suggesting it to be the final product. Vanillic acid was converted to guaiacol, while caffeic acid was transformed to 4-ethylcatechol via 4-vinylcatechol. The complete genome of TAB7 has been sequenced with a sequencing depth of 91x. It is composed of one chromosome (4.37 Mb) and two circular plasmids (42 kb and 31 kb). Preliminary annotation results suggest that the plasmids carry growth regulatory and numerous phage-related genes, while candidate phenolic acid-degradative genes have been identified in the chromosome. These candidates include a putative phenolic acid decarboxylase (pad) gene whose product is thought to decarboxylate ferulic and caffeic acids and a vanillic acid decarboxylase gene whose product is thought to decarboxylate vanillic acid. The heterologous expression of these genes in *E. coli* is currently underway.

1) T. Kimura *et. al*., ORBIT (Organic Resources and Biological Treatment) Conference (2014).

Biotransformation, Bacillus licheniformis TAB7, Phenolic compounds

発表責任者：Nojiri Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A11a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A11 会場

Isolation and characterization of dibenzofuran degrading bacteria from Vietnamese soil

○NGOC THI TRAN VU[1,3], HA THANH LE THI[1,3], MASAKI SHINTANI[2], HOANG LOC NGUYEN[3], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Department of Environment and Energy System, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [3]Hue College of Sciences, Hue Univ., Vietnam)

Dioxins are a group of chloroaromatic compounds known to be toxic, carcinogenic, and persistent environmental pollutants. Remediation of dioxin-polluted environments is one of the most challenging problems in environmental technology. Biological methods using particular microorganisms and microbial consortia capable of transformation and degradation of dioxin have greater advantages than physical or chemical methods in their application for environmental remediation. Dibenzofuran (DF) has been used as a model compound for the investigation of the bacterial degradation of dioxins. In Vietnam, due to historical reason, there are many sites heavily contaminated with chemical reagents, especially dioxin. In those sites, there are serious environmental problems but certain microorganism strains with specific ability to metabolize toxic chemicals also exist. In this study, we isolated and characterized DF-degrading bacteria from Vietnamese soil. We used enrichment culture using a mineral salts medium (W medium) supplemented with DF as the sole source of carbon and energy for the isolation of DF-degrading bacteria from five different soil samples at 30ºC and 50ºC. We isolated eight DF-degrading bacteria at 30ºC and four degraders at 50ºC. The isolates were identified by sequences of their 16S rRNA gene, and all these strains were identified as genus *Paenibacillus*. For further characterization, we chose representative strains, 1-10 and 4B1, from the isolated degraders at 30ºC and 50ºC, respectively. The 16S rRNA gene sequences of 1-10 and 4B1 are 99% identity with a DF-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. YK5 (Iida *et al*., 2006, Arch Microbiol 184: 305-315). The relative growth rate on W medium with 1000 and 1500 mg/L DF were very similar but the final cell density with 1500 mg/L DF was higher than that with 1000 mg/L DF. Strain 4B1 could grow on W medium with 1000 mg/L DF at temperature from 30-50ºC but not at 55ºC. The optimum growth temperature of 4B1 was 40-45ºC (OD_{600} about 1.2 after 30 h). The metabolic capability of isolated strains was investigated for several aromatic hydrocarbons. The isolates could grow on naphthalene, salicylate, gentisate but not on catechol. These results suggested that the DF metabolic pathway of isolated strains could be via salicylate and gentisate.

dibenzofuran, enrichment culture, Paenibacillus

発表責任者：Kazuhide Kimbara（tkkimba@ipc.shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A11a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A11 会場

Genome sequence analysis of dibenzofuran degrading bacteria and cloning of its degradation genes

○HA THANH LE THI[1,4], NGOC THI TRAN VU[1,4], MASAKI SHINTANI[2], RYOTA MORIUCHI[3], HIDEO DOHRA[3], HOANG LOC NGUYEN[4], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Department of Environment and Energy System, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [4]College of Sciences, Hue University, Vietnam)

Microorganisms play important roles in conversion and mineralization of dioxins in natural environments. Dibenzofuran, a non-halogenated analogue of dioxin, is regarded as a model compound in dioxin biodegradation studies. Two *Paenibacillus* sp. strains (4B1 and 1-10) were successfully isolated from Vietnamese soil, which is contaminated with dioxin, in the presence of dibenzofuran as a sole carbon and energy source. These strains can utilize dibenzofuran at different optimal temperatures and had some different characteristics.

The key enzymes in dibenzofuran degradation are multi-component Rieske-type aromatic ring-hydroxylating oxygenases (ROs), which catalyze the initial and several steps of the degradation. We determined draft genome sequences of these two strains using MiSeq platform (Illumina), analyzed with respect to RO genes, and compared with other strains of genus *Paenibacillus*. There were 26 RO gene sequences which located on 9 contigs of strain 4B1 while strain 1-10 had 23 sequences on 10 contigs. Phylogenetic analyses among the RO homologues obtained in this study and RO databases were conducted. The presence of putative ROs in strain 4B1 and 1-10 revealed that these *Paenibacillus* strains had a potential ability to degrade several aromatic hydrocarbons. Then we tested the metabolic ability of these strains with biphenyl, naphthalene, carbazole, dibenzo-p-dioxin, benzoate and pyrene. As a result, they were able to metabolize naphthalene and benzoate in addition to dibenzofuran. To identify genes involved in the dibenzofuran degradation, we compared the genome of these strains to another dibenzofuran-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain YK5 (Iida et al., 2006, Arch Microbiol 184: 305-315) as a reference. We found the gene sets in both strains 4B1 and 1-10, which showed 99-100% and 98-100% identity in amino acid-level with those of strain YK5, respectively. This gene cluster consisted of four genes *dbfA1*, *dbfA2*, *dbfB* and *dbfC* encoding dibenzofuran dioxygenase alpha subunit, beta subunit, extradiol dioxygenase and hydrolase, respectively. These results demonstrated that complete mineralization of dibenzofuran by these *Paenibacillus* strains can occur via angular degradation pathway which started with the hydroxylation by an angular dioxygenase, then *meta*-cleaved 2,2',3-trihydroxybiphenyl to generate salicylic acid. The extradiol dioxygenase gene (*dbfB*) of both strains were then cloned into pET21b vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 for enzymatic activity characterization.

dibenzofuran, Paenibacillus, aromatic ring-hydroxylating oxygenase

発表責任者：Kazuhide Kimbara（tkkimba@ipc.shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A11a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A11 会場

白色腐朽菌によるアセタミプリド分解に関与するシトクロム P450 遺伝子の同定
Identification of a cytochrome P450 gene involved in the degradation of acetamiprid by white rot fungi

○大野 遥[1]、一瀬 博文[2]、森 智夫[1]、河岸 洋和[1,3,4]、平井 浩文[1,3]([1]静大農・応生科、[2]九大院・農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○Haruka OONO[1], Hirofumi ICHINOSE[2], Toshio MORI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4], Hirofumi HIRAI[1,3] ([1]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Kyusyu Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

世界で広く使用されている殺虫剤の一つであるネオニコチノイド系殺虫剤（NEOs）は、1990 年代に開発された比較的新しい農薬である。NEOs はニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストであり、昆虫の中枢神経系を撹乱することによって選択的な生物学的毒性を発揮する。最近では、その残効性や植物浸透移行性に由来する環境に対する悪影響やヒトへの影響が懸念されており、将来的に社会問題化する危険を孕んでいる。そのため NEOs の完全分解・無毒化技術を予め備えておく事は重要な課題であると考えられる。

我々はこれまでに、白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によって、種々の NEOs が分解可能であることを報告しており、その反応には主にシトクロム P450（CYP）が関与していることを明らかにしている[1, 2]。白色腐朽菌は 100 を超える CYP を有しているが、どの CYP ファミリーによって NEOs が代謝されているかは明らかになっていない。そこで、モデル白色腐朽菌である *P. chrysosporium* 由来の CYP 遺伝子を酵母に形質転換した機能スクリーニングシステムを用いて、NEOs 代謝に関与する CYP 遺伝子の同定を試みた。

NEOs の一種であるアセタミプリド（ACE）を基質としたとき、CYP5147A3 組換え酵母により、ACE は 6-chloro-3-pyridinemethanol（IM 0）に代謝された。*P. chrysosporium* 生菌処理による ACE 分解においても IM 0 は代謝物として同定されたため、CYP5147A3 が *P. chrysosporium* による ACE 分解に関与していることが明らかになった。CYP5147A3 は酸化反応を触媒していると考えられており、これまでに *O*-脱エチル、S 酸化、ステロイド 11-ß 水酸化反応に関与することが報告されている[3]。ACE を基質とした場合は、メチレン位の酸化を経て *N*-脱アルキル化反応が起こっていることが予想される。

【参考文献】
1) J. Wang *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 831-835 (2012).
2) T. Mori *et al., J. Hazard. Mater.,* 321, 586-590 (2017).
3) S. Hirosue *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 407, 118-123 (2011).

white rot fungi, neonicotinoid, cytochrome P450

発表責任者：平井浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A11a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A11 会場

Paraburkholderia sp. KU-46 株の 2,4-DNP 分解系遺伝子の解析
Analysis of 2,4-dinitrophenol degradation genes from *Paraburkholderia* sp. strain KU-46
○山本 泰誠、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大学）
○Taisei Yamamoto, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa (Kansai Univ.)

【目的】

Paraburkholderia sp. KU-46 株は 4-ニトロフェノール(4NP)を経由する経路で 2,4-ジニトロフェノール(DNP)を分解する。我々は、DNP から 4NP への変換は、H^--DNP(Hydride-Meisenheimer complex)を経由していると推定しており、4NP モノオキシゲナーゼ遺伝子(*dnpC1C2*)近傍に、DNP から 4NP への変換に関与すると推定される *dnpA, dnpB* 遺伝子を見い出してている。本研究では、大腸菌発現系を利用した DnpA および DnpB の機能解析を試みた。

【方法・結果】

pET システムを用いて DnpA および DnpB 発現大腸菌を作成し、固定化金属アフィニティクロマトグラフィーで DnpA、DnpB を精製した。精製酵素による DNP 変換試験を行った結果、DnpA は、DNP を H^--DNP へ変換する反応を触媒し、DnpB は H^--DNP を 4NP へ変換する反応を触媒することが明らかになった。これらのことから、DNP から 4NP は、H^--DNP を経由することが確認された。更に、DnpA、DnpB による 2,4,6-トリニトロフェノール(TNP)の変換試験を行った結果、KU-46 株は TNP 資化能を有していないにも関わらず、DnpA は TNP を H^--TNP および $2H^-$-TNP(Dihydride-Meisenheimer complex)へ変換し、DnpB は H^--TNP および $2H^-$-TNP をそれぞれ DNP および 4NP へ変換することが明らかとなった。

2,4-dinitrophenol, 4-nitrophenol, *Paraburkholderia*

講演番号：3A11a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A11 会場

絶対嫌気性菌の安定的な大量培養法の提案

A stable large-scale cultivation system for growing strict anaerobes

○内野 佳仁 (製品評価技術基盤機構)
○Yoshihito UCHINO (NITE)

製品評価技術基盤機構（NITE）は、建設業界におけるバイオ技術の利用（バイオレメディエーション）を念頭に、有用機能が明らかな微生物の実用化に向けた安定した培養技術の構築を行っている。本発表では、我々が開発した絶対嫌気性菌の培養法を提案する。嫌気性菌の大量培養は技術的に難しくコストもかかることから困っている企業・研究者は多い。本成果が産業界への導出に繋がることを期待し報告を行うものである。

我々は、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）および経済産業省からの受託事業「次世代型バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」（平成 22 年度～平成 26 年度）に参画し、大成建設と共同で、塩素化エチレン類を対象とした浄化において中心的働きをする *Dehalococcoides* 属細菌 UCH007 株の分離に国内で初めて成功し、当該微生物を直接汚染現場に導入するバイオオーグメンテーションへの適用を検討したが、当該微生物は難培養性の絶対嫌気性菌であり大量培養化が課題であった。我々と大成建設が共同開発した *Sulfurospirillum* 属細菌との共培養技術（特許第 6103518 号）は、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖を安定化させ、増殖速度・脱塩素化能を格段に向上させることができたが、気密性の保証された条件でしか効果が発揮されないため、培養スケール 500ml 程度までしか培養に成功せず、残念ながら大量培養化までは至らなかった。

我々は、プロジェクト終了後も検討を継続し、*Dehalococcoides* 属細菌の安定的な大量培養法の確立に成功した。本方法は、*Dehalococcoides* 属細菌を培養速度、収量共に小スケール培養と遜色なく培養することができるだけでなく、簡単・低コストであり、運搬も容易なことから、我々は *Dehalococcoides* 属細菌以外の絶対嫌気性菌にも広く適用できるものと考えている。発表では本培養システムの詳細について報告する。

large-scale cultivation, strict anaerobes, Bioaugmentation

発表責任者：内野佳仁（uchino-yoshihito@nite.go.jp）

講演番号：3A11p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A11 会場

微生物と線虫を用いた生物濃縮による ^{137}Cs 除染法の検討

Investigation of ^{137}Cs decontamination method by bioaccumulation using microorganisms and Nematodes

○合田 亮[1]、伊藤 みさご[1]、星 英之[2]、倉橋 健介[3]、吉原 静恵[4]、徳本 勇人[4]（[1]阪府大院・工、[2]阪府大院・人社、[3]阪府大高専、[4]阪府大院・理）
○Ryo GODA[1], Misago ITO[1], Hideyuki HOSHI[2], Kensuke KURAHASHI[3], Shizue YOSHIHARA[4], Hayato TOKUMOTO[4] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Humanities and Sustainable Syst. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol., [4]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】福島第一原発事故により拡散した放射性物質のうち、^{137}Cs は半減期が長いため、長期に渡る被曝が懸念される。さらに、森林や山地などの居住範囲外の低線量の汚染地域の除染は、後回しなってしまうため、膨大な量の汚染土壌が残存している。そのため、費用対効果の高い微生物による除染が注目されているが、土壌中の ^{137}Cs を吸収した微生物の簡便な回収方法がないため、実用化に至っていない。そこで、土壌中の微生物を線虫に捕食させることで、^{137}Cs を線虫体内に生物濃縮できるのではないかと考えた。さらに、線虫の光及び熱忌避性を利用し、土壌から線虫を回収することで、^{137}Cs を回収する新たなバイオレメディエーション技術の構築に繋がると着想した。本研究では、線虫の培養条件の検討及び、^{137}Cs 吸収菌から線虫体内への ^{137}Cs の移行について検討を行った。
【方法・結果】本実験では、線虫のモデルとして *Caenorhabditis elegans*、^{137}Cs 吸収菌のモデルとして *Rhodococcus erythropolis* CS98 株を用いた。まず、表面積が異なる寒天培地に、単位表面積当たりの線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の投与数が一定となるように、線虫及び ^{137}Cs 吸収菌を投与し、20℃で 13 日間静置培養し、培養中の線虫数を計数した。その結果、表面積によらず、10~11 日目で線虫数が最大となった。さらに、単位表面積当たりの線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の投与数を変化させ、培養を行ったところ、線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の投与数が増加するほど、線虫数が最大となる日数が短くなった。以上より、線虫数が最大となる日数は、線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の初期投与数に依存することが明らかになった。したがって、線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の投与数を変化させることで、線虫数が最大となる日数を制御できる可能性が示唆された。次に、非放射性 Cs を吸収させた ^{137}Cs 吸収菌を線虫に給餌し、20℃で 9 日間静置培養した。培養後、回収した線虫体内の Cs 量を測定したところ、^{137}Cs 吸収菌が吸収した非放射性 Cs のうち 28.6%が、線虫体内へ移行した。この結果から、線虫による生物濃縮を利用した Cs の回収が可能ではないかと考えられる。また、非放射性 Cs による線虫の増殖阻害がみられたが、線虫及び ^{137}Cs 吸収菌の初期投与数を増加させると、線虫数が増加するため、Cs 回収量の向上が期待できる。さらに、100、1000 Bq/mL となるように ^{137}Cs を調整した培養液中で、^{137}Cs を吸収させた ^{137}Cs 吸収菌を線虫に給餌し、20℃で 9 日間静置培養した。培養後、ガンマカウンターを用いて、回収した線虫から放出されるガンマ線を計測した。その結果、初期検討ながら、回収した線虫から放出されるガンマ線の検出に成功したため、^{137}Cs が ^{137}Cs 吸収菌から線虫体内へ移行したことを確認できた。以上より、食物連鎖による生物濃縮を用いた ^{137}Cs 回収のプロセス構築が可能ではないかと考えている。

Nematodes, Radioactive substances, Bioremediation

講演番号：3A11p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A11 会場

重金属含有バイオマスにおける微生物と線虫を用いたバイオレメディエーションプロセスの構築
Construction of bioremediation process using microorganisms and nematodes in heavy metal containing biomass

○岡野 凌一[1]、濵野 樹[2]、倉橋 健介[3]、吉原 静恵[2]、徳本 勇人[2] ([1]阪府大院・工、[2]阪府大院・理、[3]阪府大高専)
○Ryoichi OKANO[1], Istuki HAMANO[2], Kensuke KURAHASHI[3], Sizue YOSHIHARA[2], Hayato TOKUMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol.)

【背景・目的】重金属吸収能に優れた植物を用いるファイトレメディエーションは、低濃度の汚染地域を対象に広範囲な除染に適している。しかし、植物体あたりの回収率が低いために、重金属を吸収した大量の植物バイオマスが廃棄物として発生する。そこで、この植物バイオマスを微生物によって分解し、増殖した微生物が重金属を吸着・吸収し、この微生物を線虫による捕食で回収することができれば、生物濃縮を利用した新たなバイオレメディエ―ション技術の構築に繋がると考えた。本研究では、嫌気発酵汚泥に重金属を添加して培養し、増殖した微生物によるバイオガス生成量及び、固相への重金属の移行量を測定した。さらに、次世代シークエンサーにより、汚泥を構成する菌叢構造を解析し、最後に、線虫 *Caenorhabditis elegans* を使用し、汚泥に投与した Cd の回収試験を行った。
【方法及び結果】除染対象の重金属として、公害の原因物質として知られるカドミウム(Cd)を用いた。嫌気発酵汚泥を 40v/v%、でんぷんを発酵基質として 2 g/L、Cd を任意の濃度になるようにバイアル瓶に封入した。その後、気相を窒素置換後 37℃で静置培養を行った。ICP-MS を用いて固相中の Cd 濃度を測定した結果、液相に添加した Cd の 80%以上が 30 分で固相に移行した。さらに、Cd 投与後 3 時間経過しても、固相中の Cd 濃度に変化がなかったため、Cd が微生物に吸着あるいは吸収される可能性が示唆された。そこで、逐次抽出法により微生物の Cd 吸着量を画分化して分析を行った。Cd 投与後 1 日培養した汚泥を回収後、遠心分離により固相を回収した。回収した固相を純水及び 0.11M 酢酸水溶液で洗浄した洗液と、洗浄後の固相中の Cd 濃度を測定した。純水、0.11M 酢酸水溶液に遊離した Cd を付着分、吸着分もしくは炭酸塩分、固相に残存する Cd を吸収分、もしくは強固な結合分と定義した。その結果、液相に投与した Cd のうち約 85%が微生物に吸収、もしくは強固に結合されていることが分かった。また、培養期間中のバイオガス生成量および、発酵終了汚泥の菌叢解析結果において、Cd の有無による変化が見られなかったため、嫌気発酵汚泥が Cd 耐性を有しながら、嫌気発酵を良好に行っていることが明らかとなった。そのため、植物バイオマスを嫌気発酵分解し、減容化を達成できる可能性が示唆された。最後に、Cd が移行した嫌気発酵汚泥を、餌として線虫を培養し、培養後、回収した線虫が吸収した Cd 量を測定した。その結果、嫌気発酵汚泥中から最大で 30%近くの Cd を回収できた。以上の結果から、ファイトレメディエーションとバイオレメディエーションを融合した、Cd の高効率回収プロセスを構築できるのではないかと考えている。今後は、前段の嫌気発酵処理、後段の線虫による Cd 吸収菌の回収プロセスの操作因子について、最適化検討を行う。

Nematodes, Heavy metal pollution, Bioremediation

講演番号：3A11p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A11 会場

活性炭とバイオレメディエーションの組み合わせによる土壌浄化技術の開発

Development of the purification system of petroleum oil-contaminated soil using activated carbon and hydrocarbon-degrading bacterium

○川越 大樹[1,2]、久保田 謙三[1]、河目 裕介[1]、吉田 和生[1]、アディカリ ディネシュ[2]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2] ([1]大和ハウス工業、[2]立命館大学)

○ Taiki KAWAGOE[1,2], Kenzo KUBOTA[1], Yusuke KAWAME[1], Kazuo YOSHIDA[1], Dinesh ADHIKARI[2], Kiwako ARAKI[2], Motoki KUBO[2] ([1]Daiwa House Industry Co.,Ltd., [2]Ritsumeikan Univ.)

【背景と目的】

鉱油類による土壌汚染は生態系や生活環境へ影響を及ぼすだけでなく、土地取引においても「油臭」、「油膜」、「油分濃度」などが問題となっている。これまで、我々の研究グループでは、鉱油類による壌汚染対策として *Rhodococcus* 属細菌や *Gordonia* 属細菌を用いた高効率のバイオレメディエーション技術を開発してきた。これにより、掘削除去や従来のバイオレメディエーション技術に比べて環境負荷や浄化コストを抑えることができた。しかし、従来は油分濃度の低減が主な指標となっていたため、施工時や施工後の一定期間は油臭・油膜を解消できないという課題があった。そこで、油臭・油膜を迅速に解消すると共に、油分濃度を低減できる新たなバイオレメディエーション技術の開発を目指した。

【方法と結果】

ビーカースケールでの室内配合試験により鉱物油類による油臭の消臭効果を検証した。各種吸着剤や 100 種以上の種類の活性炭を用いて、土壌に混合して消臭した試験体を官能試験にて評価した結果、比表面積が約 400m²/g 以上などのある物性をもつ活性炭などの炭素系吸着剤に大きな効果があることがわかった。さらに、これらのうち、消臭効果の高い数種の活性炭を用いて、油膜解消の効果を検証した。シャーレ法による油膜解消の評価を行ったところ、ほとんどの活性炭において油膜を解消することが確認できた。

また、*Rhodococcus* 属細菌との組合せ効果の検証を行ったところ、単純に活性炭と油分解菌を組み合わせただけでは油分解効率は増加しないことがわかった。このように、活性炭により油分分解効果が阻害される場合があるため、バイオレメディエーションに適した活性炭の条件を検討した。その結果、355～817m²/の比表面積であり、150μm 以下の粒径などの物性条件が適した活性炭を用いることで、油臭・油膜の解消と油分解を両立することができることがわかった。

Activated carbon, Petroleum oil-contaminated soil, Bioremediation

発表責任者：川越大樹（gr0320rp@ed.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3A11p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A11 会場

ＰＧＡイオンコンプレックスを利用した活性炭の効率的な除菌担体化

Development of PGAIC-coated active carbons for effective elimination of water-borne bacteria

○白米 優一[1]、山口 かなえ[2]、芦内 誠[1,2] ([1]愛媛大院連合農、[2]高知大農)
○Yuichi HAKUMAI[1], Kanae YAMAGUCHI[2], Makoto ASHIUCHI[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]Kochi Univ.)

【背景】水は生物にとって必要不可欠な資源である。そのため水質の良し悪しは、我々の生活を左右する。高品質な水が我々の生活環境を向上・安定させる一方で、汚染水がもたらす健康被害は甚大なものとなる。水を介する健康被害の原因の１つに病原細菌によるものが挙げられる。例えば、大腸菌に汚染された水や食物を摂取すると下痢や嘔吐等にみまわれ、最悪の場合、死に至る。現在、水質の改善・浄化等に利用される資材は活性炭が主流である。活性炭はその多孔質性を活かした広大な表面積に多くの有害物質等を吸着させ、汚染水を浄化している。しかし、先に挙げたような細菌に対する水浄化（抗菌）能力までは備えておらず、迅速かつ安価に病原微生物を除去できる材料の開発が望まれている。一方で、当研究室では超吸水性バイオポリマー、ポリ−γ−グルタミン酸（ＰＧＡ）の改質研究に取り組んできた結果、水不溶性新素材、ＰＧＡイオンコンプレックス（ＰＧＡＩＣ）を開発することに成功している。アニオン性バイオポリマーであるＰＧＡのカウンターパートナーにカチオン性化合物（ヘキサデシルピリジニウムカチオン：ＨＤＰ$^{+}$）を選択し、単純混和することにより得られるＰＧＡＩＣはＰＧＡ由来の高度な接着性と、抗菌・抗ウィルス性を備えていることがこれまでの研究から明らかになってきた。ただし、その機能は材料表面と対象物表面の界面に限られるため、事実上小規模である。そこで活性炭を支持体とし、ＰＧＡＩＣを吸着させることで両者の短所を補完した、目的に適う効率的な除菌担体の作製を試みた。
【結果・考察】エタノールに溶解したＰＧＡＩＣに活性炭を浸漬後、乾燥させたものを除菌担体とした。これをＢＰＢ溶液に曝したところ、無処理の活性炭では認められたＢＰＢ色素の吸着が見られなかったことから、活性炭表面の大部分がＰＧＡＩＣでコーティングされたとの結論に達した。大腸菌を含む汚染水モデル（～２．０×１０^{4}ＣＦＵ／ｍＬ）に本担体を投入したところ、顕著な除菌効果が得られた。さらに、本担体を詰めた除菌カラムを利用することで、より高い効果（＞１ＣＦＵ／ｍＬ）が認められた。現行の水質基準評価に照らしても十分に飲用水としての基準をクリアしていることがわかった。活性炭そのものにはなかった抗菌能を付与できたことに加え、本除菌担体は比較的安価で作製可能である。除菌に要する操作も単純かつ容易である。これらのことから、目的に適う効率的な除菌担体が作製できたと結論付けた。

poly- γ -glutamate, active carbons, bacteria elimination

講演番号：3A11p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A11 会場

微生物を利用した新規汚泥減容化システム

Novel method of sludge volume reduction by using microorganisms

○柳瀬 亜美[1]、黒住 悟[2]、石田 秀樹[2]、倉根 隆一郎[1] ([1]中部大学、[2]積水アクアシステム株式会社)
○Ami Yanase[1], Satoru Kurozumi[2], Hideki Ishida[2], Ryuichiro Kurane[1] ([1]Chubu Univ., [2]Sekisui Aqua Systems Co.,Ltd)

［目的］

日本の下水処理およびし尿処理のほとんどが活性汚泥法によるものである。それらの施設では、処理の過程で余剰汚泥が大量に発生する。発生した余剰汚泥は脱水、焼却、埋め立て等によって処分されるが、高コストや悪臭などの問題を抱えており、余剰汚泥の削減が求められている。現在、余剰汚泥を削減するために様々な方法が開発されているが、従来のエンジニアリング的な手法では設備コスト、エネルギーコストともに負担が大きくなることから普及には至っていないのが現状である。そこで、微生物学的な面からアプローチを行うことにより、より省エネルギー・低コスト化を可能とする新たな汚泥減容化技術を開発することを目的とした。本研究では、し尿処理場の活性汚泥から汚泥減容に関与する微生物 2 種類の単離を行い、これらの微生物を組み合わせた新規汚泥減容化システムを考案した。

［方法］

強力アセチル化酵素生産菌の粗酵素液とアミノ酸 20 種を反応させ、LC/MS でアミノ酸のアセチル化を確認した。また、プロテアーゼおよびアセチル化酵素活性測定キットを用いて培養条件(培地組成、日数など)の検討を行った。

［結果］

L-アミノ酸をアセチル化させた結果、20 種類中 9 種類のアミノ酸においてアセチル化が認められた。また、様々な培養条件で検討を行った結果、二種類の微生物それぞれに適した培養条件が見つかった。

activated sludge, sludge volume reduction, microorganisms

講演番号：3A11p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A11 会場

四塩化炭素汚染地下水における浄化処理後の微生物叢解析

Microbial flora analysis after purification treatment in carbon tetrachloride contaminated groundwater

○吉田 拓也、高品 知典（東洋大院・生命科学）
○Takuya YOSHIDA, Tomonori TAKASHINA (Grad. Sch. Toyo Univ.)

【背景・目的】
四塩化炭素は過去にドライクリーニングの溶剤や機械器具等の洗浄に用いられてきた揮発性有機化合物の 1 つである。液体で使用された揮発性有機化合物は、土壌へ侵入するとほとんど吸着されず下方へ移動するという性質があり、過去の不法投棄や不適切処理によって環境中に漏出し、地下水汚染を引き起こすことが現在問題となっている。揮発性有機化合物に対するバイオレメディエーションでは *Dehalococcoides* 属等による還元的脱ハロゲン化反応によって汚染物質の分解が進むことが明らかとなっており、反応酵素についても多く報告されている。本研究では、活性化剤添加のバイオレメディエーションによって四塩化炭素濃度の減少が認められた地下水を研究対象とし、浄化処理後の微生物を解析すること、及びどのような酵素によって四塩化炭素が分解されているかを検討することを目的とした。
【方法】
浄化処理前後の地下水サンプルから DNA を抽出・精製し、touch down PCR により真正細菌用のプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の V3 領域を増幅した。その後、DGGE 法により分離したバンドから DNA を再度抽出し、同条件で PCR を行い DNA 増幅後、シークエンス解析を行った。塩基配列決定後、BLAST 検索を行い微生物種を推定した。また既知の還元的脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて PCR 増幅した。
【結果および考察】
浄化処理後の地下水サンプルから *Dechloromonas* 属と相同性が高い DNA バンドが多く検出された。*Dechloromonas* 属は、過塩素酸の脱塩素化を行うことが知られており、浄化処理後の地下水サンプルから多く検出されたことから、今回の四塩化炭素の分解に関与した可能性が示唆された。現在、四塩化炭素を分解している酵素の検討のために、既知の還元的脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子断片の増幅を試みている。

Carbon tetrachloride, Microbial flora analysis

講演番号：3A11p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A11 会場

海洋微生物の環境汚染物質分解への利用と機構解明

Utilization and mechanism elucidation of marine microorganisms for decomposition of environmental pollutants

○四方 浩貴、鎌田 泰彰、安部 智子、椎葉 究（東京電機大）
○Hiroki YOMO, Yasuaki KAMATA, Tomoko ABE, Kiwamu SHIIBA (Tokyo Denki Univ.)

（目的、方法）1,4-ジオキサンは、主に有機塩素化合物の安定剤として、ワックス、化粧品、プラスチック等様々な製品に用いられている。国内では、H21 年 11 月に「健康保護に係る水質環境基準項目」及び「地下水環境基準項目」に追加され、基準値は、共に 0.05mg/L 以下と定められている。水に対する高い親和性と、VOC と比較して揮発性が低い性質であるため、化学工場付近の地下水を汚染する事例が確認されている。この 1,4-ジオキサンを浄化するにあたり、UV 照射やオゾン処理といった物理化学的処理法が有効であるとされているが、装置が高価であること、二次環境汚染の懸念、設置場所の確保が必要であり処理コストが高いなどのデメリットがある。一方、微生物によるバイオレメディエーションは、時間を要するものの低コストであり二次環境汚染のリスクが低く複雑な管理を必要としないメリットがある。近年、1,4-ジオキサンの分解能を持つ微生物が、ごく僅かではあるが陸圏で発見されている。本研究では陸圏より貧栄養状態かつ厳しい環境条件である海洋に生息する微生物を、1,4-ジオキサンのような環境汚染物質の生分解に利用するバイオレメディエーション法の研究を行った。今回、難分解性有機汚染物質を集積・単離できる海水－木炭還流法により、海水から 1,4-ジオキサン分解菌の集積・単離及びその特性について検討した[*1]。1,4-ジオキサン濃度は、HPLC による測定法を新たに開発し、継時的に測定した。

（結果、考察）海水・木炭還流法による集積試験を開始してから 15 日後に還流液中の 1,4-ジオキサン消失速度が高まることが確認された。還流 17 日後の装置内の木炭を粉砕、緩衝液で懸濁し、希釈液を 1,4-ジオキサンを唯一の炭素源とした添加した BSM 寒天培地に平板塗抹した。その結果、3 種類のコロニーが確認され、1,4-ジオキサン分解能を比較した。その中で 1 種類だけ 1,4-ジオキサン分解能が高いことが確認された（以下、その菌株を K3-4 株とする）ので、その特性について検討した。K3-4 株を Blast を用いて遺伝子解析を行なった結果、*Rhodococcus erythropolis* の可能性が高いことが判明した。K3-4 株は、1,4-ジオキサン 600mg/L を唯一の炭素源とした BSM 液体培地（好気培養）において、4 日間で約 400mg/L の 1,4-ジオキサンを分解することが確認された。波長 600nm で 7 日間測定したところ、日数が進むにつれて微生物が増えていることが分かった。1,4-ジオキサン分解酵素である Dioxane monooxygenase の存在を確認するために、DXMO プライマーを用いた PCR 産物でアガロースゲル電気泳動を行なった結果、K3-4 株からそのバンドが確認できた。よって、1,4-ジオキサンを分解する能力があると示唆された。

[*1]Matui *et.al.* Biodegradation 27:155-163(2016).

bioremediation, 1,4-dioxane, marine microorganism

講演番号：3A11p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A11 会場

セレン酸還元細菌 Pseudomonas stutzeri NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理（その 3）
Bioremediation of selenium contaminated soil using selenate reducing bacterium Pseudomonas stutzeri NT-I (Part3)

○小竹 史哉[1]、大塚 治[2]、山下 光雄[1]、西里 亮[3]、奥野 稔[3]、武藤 宏行[3]、佐々木 雄一[3]([1]芝浦工大 工 応化、[2]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター、[3]株式会社ケー・エフ・シー)
○ Fumiya KOTAKE[1], Osamu OTSUKA[2], Mitsuo YAMASHITA[1], Ryo NISHIZATO[3], Minoru OKUNO[3], Hiroyuki MUTOU[3], Yuichi SASAKI[3] ([1]Appl. Chem., Eng., Shibaura Inst. Tech., [2]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tec., [3]KFC LTD.)

[緒言]

セレン(Se)は低濃度で自然中に広く分布している元素であり、土壌中では主に可溶性なセレン酸(SeO_4^{2-})や亜セレン酸(SeO_3^{2-})として存在している。これらは毒性を持ち雨水で溶出することから、環境省告示第 18 号によって土壌溶出量 0.01 mg/L という基準が定められている。現在、汚染土壌中の亜セレン酸は薬剤によって溶解性を低下させる物理化学的な不溶化処理が行われているが、同薬剤はセレン酸との反応性が低いためセレン酸汚染土壌の不溶化処理は困難である。よって新しい土壌処理法が望まれる。

これまでセレン酸を難溶性の元素態セレン(Se)に還元する細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離し、本細菌を用いて廃水の微生物処理に成功した。次に NT-I 株培養液をセレン酸模擬汚染土壌に添加し培養することで溶出量基準を達成することができた(1)(2)。そこで本研究ではセレン汚染土壌で NT-I 株を用いて溶出量基準を達成させる事を目的とした。

[方法]

セレン汚染土壌 1 kg に濁度 OD_{600} = 1.0 に調整した NT-I 株培養液を重量体積比で 40%添加し、20℃で静置培養した。0,24,48,72 時間目に一部をサンプリングした。風乾後これらの土壌を乳鉢と乳棒で破砕し、粒径を 2 mm 以下にした。調整した土壌に塩酸で pH 6.0 に調整した純水を重量体積比で 10%加え、混合液を 6 時間振とうした。混合液を遠心分離機にかけ、上清をフィルター濾過し、濾液を検液とした。検液に含まれるセレン濃度を誘導結合プラズマ発光分光装置(ICP-AES)によって定性定量した。

[結果]

本実験においてセレンの溶出量は 0 時間目で 0.016 mg/L だったが、72 時間目では 0.01 mg/L 以下で溶出量基準を下回っていた。よって、NT-I 株を添加することによりセレン汚染土壌の溶出量基準を達成することができた。以上の結果から、NT-I 株を利用した新たなセレン汚染土壌処理方法を開発できる可能性が示された。

(1) 福澤ら，日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集, 3J27a05
(2) 大塚ら，日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集, 3J27a06

Selenate reducing bacteria, Bioremediation

発表責任者：小竹　史哉（ad14037@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3A11p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A11 会場

Rhodococcus erythropolis PR4 株を用いた微生物細胞入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性
Effects of micelle solutions containing *Rhodococcus erythropolis* PR4 on the degradation of crude oil
○田上 晃二、岩淵 範之、砂入 道夫（日大生資科　応生科）
○Koji Tanoue, Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi (Nihon Univ.)

【目的】
Rhodococcus erythropolis PR4 株は、難揮発性有機溶媒に優れた耐性を有し、かつ、細胞がアルカン中に移行して生育できる炭化水素分解菌である。これまでの研究で本菌は、培地/アルカン二相培養系で培養した場合、添加する有機溶媒の炭素数により相互作用が異なることが知られている。すなわち、C10~C12 のアルカンでは、水／アルカンの界面に菌体が水相側に位置した状態で吸着し、C13 以上のアルカンを添加した場合では、細胞がアルカン相内へ移行し、増殖することが示されている。それ故、PR4株が有するアルカン中で生育できるという性質は、bioavailabilityの低さが問題となり、その処理が難航している高疎水性の有機化合物の分解、浄化に有用であると考えられ、微生物製剤への応用が期待されている。
一方で、超音波による水／有機溶媒の二相液の乳化は、乳化剤を使わないことから、環境負荷の少ない乳化技術として期待されている。そこで本研究では、将来的な微生物製剤の開発を念頭に置いて、PR4株がアルカン相に移行した二相培養液を超音波処理によりミセル化液を作製し、その石油分解への有効性を検討した。また、更なる分解効率の上昇を目指し、超音波処理前後の細胞の局在性の観点からアルカン分解菌3株をスクリーニングし、PR4株を含む複合培養系でのW-oil分解性を調査し、単一培養系と複合培養系間の分解効率を比較した。
【方法、結果と考察】
IB2 液体培地に各種アルカンを添加した二相培養系で PR4 株を培養し、細胞をアルカン相に移行させた。この培養液を超音波処理器により乳化処理を行い、weathered crude oil (W-oil)の分解性を検討した。その結果、ミセル化条件は他の条件に比べ序盤の分解率が高かった。続いて、分解促進効果を高めるため、複合培養系による検討を行った。予めアルカンに対する相互作用の分かっている *Rhodococcus* 属細菌 28 株を用いて、超音波処理前後で局在性が変化しない転移型 2 株、吸着型 1 株を選択した。次に超音波処理により生菌数が減少しないこと、局在性が変化しないこと等を確認した。この後、PR4 株を含む 4 株を培養し、ミセル化した後、W-oil の分解性を検討した。その結果、複合培養系による W-oil 分解率は PR4 株単独の条件と比較し、大幅に分解時間が短縮された。以上のことから、超音波処理により得られた含微生物細胞アルカンミセル液は、微生物製剤の製造法として有用である可能性が示され、且つ複合培養系を用いることでさらに分解が促進されることが示された。

micelle solution, biodegradation, crude oil

発表責任者：岩淵範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A11p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A11 会場

ウキクサの根圏に形成される細菌群集による 4-*tert*-butylphenol の分解促進
Accelerated degradation of 4-*tert*-butylphenol by a bacterial community associated with the *Spirodela polyrrhiza* rhizosphere
○西野 優希、黒田 真史、井上 大介、池 道彦（阪大院工）
○Yuki NISHINO, Masashi KURODA, Daisuke INOUE, Michihiko IKE (Osaka Univ.)

【背景・目的】根圏浄化法は、水生植物とその根圏の微生物の相互作用を利用した水質浄化技術であり、従来の物理化学的方法に替わる省エネルギーかつ環境適合型の処理法として提案されている。これまでの研究において、浮遊水生植物であるウキクサ（*Spirodela polyrrhiza*）の根圏では、phenol や aniline、4-*tert*-butylphenol（4-*t*-BP）などの難分解性の芳香族化合物の分解が促進されるとことが明らかになっており、また、根圏からはそれら化合物の分解細菌が多く単離されてきた。したがって、ウキクサの根圏には芳香族化合物分解細菌が集積されているものと推測されるが、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、4-*t*-BP を含む環境水中で、ウキクサの植栽によって 4-*t*-BP の分解が促進されることを確認するとともに、ウキクサ根圏に集積する細菌群集の解析を行った。
【方法】ウキクサは、A&H 培地を用いて人工気象器内で無菌的に継代栽培していたものを使用した。細菌群集は、大学構内の池より採取した環境水を孔径 3 μm のメンブレンフィルターでろ過した後、遠心分離によって回収し、滅菌 A&H 培地に懸濁して実験に使用した。実験系として、細菌群集懸濁液に 4-*t*-BP を終濃度 0.05 mM となるように添加しウキクサを植栽した系（A）、細菌群集懸濁液にウキクサを植栽した系（B）、細菌群集懸濁液に 4-*t*-BP を終濃度 0.05 mM となるように添加し、静置培養した系（C）、回転振盪培養した系（D）を作製した。12 日間培養後、すべての系からウキクサと培養液を採取し、シカジーニアス DNA 抽出試薬（関東化学）を用いて DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析を行った。
【結果】ウキクサを植栽していない系（C）では、4-*t*-BP の有意な分解が観察されなかった一方で、ウキクサを植栽した系（A）では、12 日間で初期濃度の 40%分の 4-*t*-BP が分解されたことから、ウキクサの植栽により 4-*t*-BP の分解が促進されたことが確認された。ウキクサは一般に、根圏に酸素や根分泌物（糖、アミノ酸、有機酸など）を供給し、微生物を活性化することが知られているが、ウキクサを植栽せず回転振盪を行うことで培養液への酸素の供給を高めた系（D）でも 4-*t*-BP が有意に分解されなかったことから、ウキクサによる 4-*t*-BP の分解促進は酸素の供給によるものではないことが示唆された。また、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析から、ウキクサを植栽した系（A）および（B）と、ウキクサを植栽していない系（C）および（D）で根圏細菌群集がそれぞれ大きく異なることが明らかとなった。以上の結果から、ウキクサの植栽により根圏に形成される細菌群集が大きく変化することで、4-*t*-BP の分解が促進されたものと考えられた。

phytoremediation, rhizobacteria, duckweed

講演番号：3A12a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A12 会場

シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からのバイオコハク酸生産

Bio-succinate production from carbon dioxide using cyanobacteria

○小山内 崇、飯嶋 寛子、鋤柄 春奈 (明治大農)
○Takashi OSANAI, Hiroko IIJIMA, Haruna SUKIGARA (Meiji Univ.)

コハク酸は、クエン酸回路の代謝産物であるが、産業界ではプラスチック原料となることが知られている。コハク酸は現在石油から合成されているが、近年、生物を用いたバイオコハク酸の生産が拡大している。少なくとも 4 つのベンチャー企業がバイオコハク酸の実生産を行っており、年間数万トン以上の生産量となっている。

現在のバイオコハク酸生産は、酵母や大腸菌などの従属栄養生物で行われている。これらのバイオコハク酸生産では糖類を炭素源とするため、原材料コストが高く、食糧と競合する可能性もある。そこで我々は、将来的な生産方式として、二酸化炭素からのバイオコハク酸生産法の開発を行っている。

我々は、単細胞性シアノバクテリアであるシネコシスティス（*Synechocystis* sp. PCC 6803）を用いて研究を進めている。シネコシスティスは、酸素発生型の光合成を行うバクテリアであり、増殖が速く、相同組換えによる遺伝子改変が可能という利点を有する。我々は、シネコシスティスを暗・嫌気条件で培養することで、コハク酸、乳酸、酢酸などの有機酸が細胞外に放出されることを発見した[1]。

シネコシスティスによるコハク酸生産を増大させるために、遺伝子改変や培養条件の改良を行っている。これまでに暗・嫌気条件でカリウムを添加することによって、コハク酸生産量が増加することを明らかにした[2]。また、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE やレスポンスレギュレーターRre37、酢酸キナーゼ AckA、ヒドロゲナーゼ HoxH などの遺伝子改変によってコハク酸生産量が増大することが分かった[1,3~5]。

現在のコハク酸生産量は暗・嫌気培養 3 日間で 420 mg/L であり、従属栄養生物を用いたコハク酸生産量（数十 g/L 以上）には及ばないが、これらの研究をさらに発展させ、シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からの効率的なバイオコハク酸生産系を開発していきたいと考えている。

参考文献

1. Osanai et al. (2015) Front. Microbiol. 6:1064
2. Ueda et al. (2016) Sci. Rep. 6:32354
3. Iijima et al. (2016) Algal Res. 18:305-318
4. Tomita et al. (2016) Front. Microbiol. 7:2050
5. Takeya et al. (2017) Plant Cell Physiol. in press

succinate, cyanobacteria, biomass

発表責任者：小山内崇（tosanai@meiji.ac.jp）

講演番号：3A12a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A12 会場

自然界からのバイオポリマーを生産する微生物の単離と応用

Isolation and Application of Microorganisms Producing Biopolymer from the Natural world

○堀口 凌佑[1]、小池 美弥[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○Ryosuke HORIGUCHI[1], Miya KOIKE[1], Minoru TANIGAWA[1], Katushi NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Junior College)

[目的]

自然界には環境変化や化学物質から身を守るために菌体外高分子を生産する微生物が多数存在すると考えられている. 現在, 微生物が生産するバイオポリマーは生分解性プラスチック, 水質浄化剤, 吸水性ゲル, 高機能フィルムなどの材料分野に役立てられており, 医療分野においても免疫賦活剤として注目を集めている. しかし, 利用されている微生物は多数存在するバイオポリマー生産菌のほんの一部だけであり, ほとんどの生産菌は未利用, もしくは未検討のままである. こうしたバイオポリマー生産菌のスクリーニングとバイオポリマーの分析は, 基礎生物学のみならず応用的見地からも重要である. 本研究では, 自然界から有用なバイオポリマー生産微生物を単離し, その性質を調べ, バイオソープション素材あるいはバイオカタリストとして利用することを目的とした.

[方法及び結果]

埼玉県東松山市の土壌から, LB 培地を用いた希釈平板法により, SH-R3 株を単離した. SH-R3 株からゲノム DNA を抽出し, rDNA の増幅と配列解析を行った. 得られた配列は *Streptomyces abikoensis* と 99%の相同性を示した. SH-R3 株由来のバイオポリマーを PBS と蒸留水で洗浄した. 1% NaOH または 1% HCl またはその両方を順に加え, それぞれ 30 mim 静置した後, 蒸留水で洗浄した. 対照として酸･塩基で処理していないものを用いた. 酸･塩基処理後のバイオポリマーを減圧乾燥したものを調製し, 乾燥バイオポリマーとした.

それぞれのバイオポリマーをコバルトイオン (Co^{2+}: 0.1–50 mM) およびニッケルイオン (Ni^{2+}: 0.1–50 mM) 溶液に加え, 室温で 1 時間転倒混和した. Nanocolor®を用いて金属イオンを定量し, 吸着量と吸着率を算出した. その結果, NaOH 処理バイオポリマーが最大の吸着量 (Co^{2+}: 2.6±0.5 mmol/g, Ni^{2+}: 2.8±0.2 mmol/g) を示した. 金属が 0.1 mM の時に最も高い吸着率 (Co^{2+}: 98.0±1.2%, Ni^{2+}: 96.7±2.3%) を示した. 金属イオンの脱着量及び脱着率を測定した. 蒸留水で洗浄した金属イオン吸着バイオポリマー (0.05 g) に 1 M HCl を 1 ml 加え 100 rpm で 1 時間振盪した. 遠心分離後の上清に含まれる金属を定量したところ, 吸着量 2.5 mmol/g の時, 最大脱着量 (Co^{2+}: 0.4±0.1 mmol/g, Ni^{2+}: 0.9±0.1 mmol/g) を示した. また吸着量 0.2 mmol/g の時, 最大脱着率 (Co^{2+}: 64±2.5%, Ni^{2+}: 74±4.1%) を示した.

金属イオンを吸着させたバイオポリマーの触媒性能を検討する為に, アンモニアボラン法を用いて活性測定を行った. 活性測定の結果, 水素発生 (Co^{2+}: 41 ml, Ni^{2+}: 24 ml) が検出された.

Soil Microbiology, Extracellular Polymeric Substances, Biosorption

講演番号：3A12a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A12 会場

組換え微生物による実用的なポリヒドロキシアルカン酸の生合成
Biosynthesis of practical polyhydroxyalkanoates by recombinant bacteria

○森 恵美[1]、西上 明花[2]、後藤 早希[1]、阿部 英喜[3]、田中 賢二[4]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]理研-CSRS、[4]近畿大・産理工）
○Megumi MORI[1], Haruka NISHIGAMI[2], Saki GOTO[1], Hideki ABE[3], Kenji TANAKA[4], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., [3]RIKEN-CSRS, [4]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ.)

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は環境低負荷な生分解性プラスチックとして期待されている。PHA の一つであるポリ-3-ヒドロキシブタン酸[P(3HB)]は硬くて脆いため実用的ではない。一方、3HB ユニットに第 2 モノマー成分として中鎖長（C6～C12）の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）を取り込んだ P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルは丈夫でしなやかな物性を有する。そこで、本研究では PHA 生合成関連酵素遺伝子を導入したさまざまな組換え株を作製し、実用的な P(3HB-*co*-3HA)を合成することを目的とした。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）を有するプラスミド pJASc22 と脂肪酸合成経路から中鎖長 3HA ユニットを供給する *Pseudomonas* sp. 61-3 の(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子（*phaG*）と *Pseudomonas aeruginosa* の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3HA-CoA）リガーゼ遺伝子（PA3924）を挿入したプラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)を *Ralstonia eutropha* H16 の PHA 重合酵素遺伝子破壊株（H16dC）に導入した組換え株は、フルクトースを唯一の炭素源として P(3HB-*co*-6.2% 3HA)を合成した。さらに、*phaC1* 遺伝子と *R. eutropha* 由来の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB* を *Pseudomonas* sp. 61-3 あるいは/および *R. eutropha* のプロモーターで発現させる pJKSc46-*pha*、pJBB49-*phb* および pJKSc54-*phab* を pRTcAA-GMCL(Pa)を保持する *R. eutropha* H16dC にそれぞれ導入した。pJBB49-*phb*（P_{Re}, *phaC1*, *phbAB*）を導入した株においては合成された PHA の蓄積率が高くなり（15.2 wt%）、pJKSc54-*phab*（P_{Ps}, *phaC1*, P_{Re}, *phbAB*）導入株は合成されたポリエステル鎖中の 3HA 分率が高くなった（9.8 mol%）。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子をクローニングし、これを PA3924 の代わりに *R. eutropha* H16dC に導入した組換え株は P(3HB-*co*-5.4% 3HA)を合成したことから、今回クローニングした *Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子の翻訳産物は(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有すると考えられた。現在、物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)の合成と蓄積率の向上、さらには、他のモノマーユニットを取り込んだ共重合ポリエステルの合成を目指し、さらなる分子育種を進めている。

PHA, polyhydroxyalkanoate, biodegradable plastic

発表責任者：松崎　弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A12a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A12 会場

透明性を有する新規乳酸ベースポリマーの生合成

Biosynthesis of a novel lactate-based polymer with transparency

○後藤 早希[1]、龍野 菜々美[2]、松本 謙一郎[3]、阿部 英喜[4]、田口 精一[5]、田中 賢二[6]、松崎 弘美[1,2]
([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]北大院・工、[4]理研-CSRS、[5]東農大・生命科学、[6]近大・産理工)
○ Saki GOTO[1], Nanami TATSUNO[2], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Hideki ABE[4], Seiichi TAGUCHI[5], Kenji TANAKA[6], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [4]RIKEN-CSRS, [5]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [6]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ.)

【目的】ポリ乳酸（PLA）は高い透明性がある優れた生分解性プラスチックであり、通常、重金属を用いた化学重合により合成される。最近、環境低負荷な微生物合成系のポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生合成システムを利用した PLA 様物質（乳酸ベースポリマー）の合成が報告されている[1)]。これまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1(STQK)*）を利用して、乳酸（LA）と炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB)が合成されている。高い LA 分率の P(LA-*co*-3HB)は PLA と同等の透明性を有することが知られている。そこで、本研究では、さらに新しい特性を有するポリマーを合成するため、LA ユニットをはじめ、さまざまなモノマー組成からなる新規乳酸ベースポリマーを合成することを目的とした。
【方法および結果】LA ユニットを供給する D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）とプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*pct*）、3HB ユニットを供給するβ-ケトチオラーゼ遺伝子（*phbA*）とアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子（*phbB*）、中鎖長の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを脂肪酸合成経路から供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子(*phaG*)と *Pseudomonas aeruginosa* の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子（PA3924）を改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1(STQK)*）とともに大腸菌 LS5218 に導入した。また、これらの遺伝子から *phbAB* 遺伝子を除いて大腸菌 CAG18497 の組換え株を作製した。これらの組換え株を 2%グルコース含有 LB 培地にて、30˚C、48 h 培養し、合成されたポリエステルの菌体内蓄積率とモノマー組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。その結果、LS5218 組換え株は、LA ユニット、3HB ユニット、そして中鎖長 3HA ユニットからなる新規乳酸ベースポリマーP(14.4% LA-*co*-79.5% 3HB-*co*-6.1% 3HA)を合成した。このポリエステルを抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いてポリマーの分子量を測定した。その結果、このポリマーの数平均分子量（Mn）は約 5.3 万、重量平均分子量（Mw）は約 31.7 万、多分散度（Mw/Mn）は 5.9 であった。NMR 解析の結果、LA-3HB 連鎖および 3HB-3HA 連鎖の存在を特定できた。一方、CAG18497 組換え株においては、高い LA 分率の P(74.0% LA-*co*-26.0% 3HA)を合成し、このポリマーの Mn は約 1.4 万、Mw は約 2.7 万、Mw/Mn は 1.99 であった。また、NMR 解析により、LA-3HA 連鎖の存在を特定できた。P(LA-*co*-3HA)のソルベントキャストフィルムは透明性を有した。今後、このフィルムの物性を調べる予定である。

1)Taguchi, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 17323-17327(2008)

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactate-based polymer

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A12a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A12 会場

高温メタン発酵過程における生分解性プラスチックの分解機構の解析

Analysis of Decomposition Mechanism of Biodegradable Plastic via Thermophilic Anaerobic Digestion

○曽 厚嘉、大西 章博、藤本 尚志、蒋 紅与（東農大）
○Hou Chia TSENG, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Hongyu JIANG (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】事業系の食品ロスは年間 300~400 万トン発生しており、大部分が焼却・埋立処分されている。生分解などにより食品廃棄物を再利用する場合は、破砕して、容器包装類や収集用のごみ袋を分別除去する必要があり、分別過程で除けなかった容器包装類やごみ袋は生分解処理過程の配管や機械の閉塞、故障の原因となっている。現在、これらの容器包装類やごみ袋をポリ乳酸を原料とした生分解性プラスチックに置き換えようとする社会的な動きがある。このことは分別除去の手間や機械的トラブルを解消し、廃棄物の生物処理促進に寄与するものと考えられる。しかしながら、生分解性プラスチックの生分解過程における生物学的な知見は少なく、実用性の見込みについては不透明である。そこで本研究ではメタン発酵による生分解性プラスチックの分解特性と、生物学的な側面について解析を試みる。

【実験材料と方法】実験材料には、稼働中の高温メタン発酵装置（55℃）の嫌気性汚泥と、Corbion 社提供の PLLA（ポリ L 乳酸）ペレットを用いた。分解実験は 125ml 容バイアル瓶に PLLA ペレットおよび嫌気性汚泥または滅菌処理（121℃，20 分間）した嫌気汚泥、超純水を投入し、窒素置換して 55℃で行った。分解実験過程で発生したバイオガスを回収し、ガス生成量、ガス組成を測定した。また、PLLA ペレットの乾燥重量から PLA 分解率とメタン収率を求めた。分解実験後の汚泥を 0.5%乳酸ナトリウムを添加した人工培地を用いて 55℃、50rpm にて集積培養した。集積培養過程はガスの生成量、ガス組成を測定した。メタン発酵過程の菌相解析は、分解実験後の汚泥または集積培養物から DNA を抽出して、PCR-DGGE 法により行った。

【結果及び考察】55℃の高温メタン発酵による PLLA ペレット分解実験で平均 PLA 分解率は 87%以上で、メタン収率は 300ml CH_4/g PLA 以上であった。これに対して、滅菌した汚泥及び超純水に PLLA ペレットを添加した分解実験では、PLA 分解率は 35%程度であった。これらのことから、PLLA の分解は、熱などの物理的な要因と、微生物による生分解により進行するものと考えられた。また、乳酸を基質とした集積培養の過程ではメタンガスの生成が観察され、*Calderihabitans* 属、*Desulfovermiculus* 属の優占が確認された。これらの微生物は PLLA の分解過程では乳酸分解に寄与するものと考えられた。

Biodegradable plastic, Methane fermentation, PCR-DGGE

発表責任者：曽厚嘉（44616012@nodai.ac.jp）

講演番号：3A12a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A12 会場

Pseudomonas sp. ITH-B52 の生産する有機蛍光物質の化学的性質の検討
Characterization of Nonaromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activities (NAPSFA) produced by *Pseudomonas* sp. ITH-B52.
○守屋 佑里子[1]、遠藤 実夏[1]、坂野 優稀[1]、松藤 寛[2]、岩淵 範之[1]、砂入 道夫[1] ([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・食生科)
○Yuriko MORIYA[1], Mika ENDO[1], Yuuki SAKANO[1], Hirosi MATSUFUJI[2], Noriyuki IWABUCHI[1], Michio SUNAIRI[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Biosci. Biotech., Nihon Univ.)

【 目的 】
当研究室ではこれまでに、低分子リグニンであるシリンガアルデヒド(SYAL)を基質にして、その分子構造にベンゼン環を含まない世界初の有機蛍光物質(NAPSFA)を生産する菌株、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を東日本大震災後の被災地の海水より単離し、その化学構造、蛍光メカニズムを検討している(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng.2015)。そのスクリーニング過程で、ITH-SA-1 株よりも蛍光強度が強い物質を生産する株として、ITH-B52 株を単離した。本 ITH-B52 株由来の蛍光物質は、液体状態に加え、固体状態でも蛍光を示すことが示唆されており、ITH-SA-1 株の生産する蛍光物質とは、大きく異なる性質を有している。一方先行研究において、これまでの非バイオプロセスによる実験等から、有機蛍光物質の一群には、非ベンゼン系の物質群があることが示唆されている(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2016)。上述した ITH-B52 株由来の蛍光物質の性質は、その中でもかなり特徴的であると予想されることから、本研究では、ITH-B52 株由来の蛍光物質の化学的性質に検討を加えた。

【 方法と結果、考察 】
まず初めに ITH-B52 株の 16S rRNA 解析を行った結果、同菌は *Pseudomonas* 属細菌に分類された。
次に、*Pseudomonas* sp. ITH-B52 株を、SYAL を添加した MB 培地で培養し、その培養上清を取得し、凍結乾燥させた後、メタノール抽出画分を取得した。このサンプルの蛍光スペクトルを検討した結果、本サンプルは Ex 355、Em 510 nm の蛍光スペクトルを有していた。次に NMR、ATR/FT-IR 解析した結果、ベンゼン環のシグナルは検出されなかったことから、本株も SA-1 株同様、NAPSFA を生産していることが示唆された。またゲルろ過で分画した画分も液体、固体状態で蛍光を示した。
続いて、SYAL の中間代謝産物やアナログ物質を用いて、基質となる物質を検討したところ、同株は、SYAL、シリンガ酸(SYAC)、3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)を基質として、蛍光物質を生産できることが示された。さらに代謝系を検討するため、SYAL を添加した培養上清中に含まれる中間代謝産物を検討したところ、同菌は、3-MGA を基質にできるにも関わらず、その培養上清からは 3-MGA が検出されなかった。これらの結果は、ITH-B52 株は、ITH-SA-1 株とは異なる代謝系で蛍光物質を生産しているものと考えられ、SYAC の次の代謝産物が重要であると予想された。現在、その中間代謝産物の特定を試みている。

lignin, fluorescent substance, Pseudomonas

発表責任者：岩淵範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A12a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A12 会場

リグニン由来の芳香族化合物を変換して生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質について

Transformation of Lignin-Derived Aromatics into Nonaromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activities (NAPSFA)

○岩淵 範之[1]、坂野 優稀[1]、松藤 寛[2]、砂入 道夫[1] ([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・食生科)
○Noriyuki IWABUCHI[1], Yuki SAKANO[1], Hiroshi MATSUFUJI[2], Michio SUNAIRI[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Biosci. Biotech., Nihon Univ.)

【目的】

われわれは、リグニンおよび低分子リグニン類を、微生物を用いたバイオプロセスにより高付加価値物質へ変換する取り組を行っており、これまでに、低分子リグニンの一種、シリンガアルデヒド(SYAL)を変換、重合し有機蛍光物質を生産する菌株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を海水より単離している。ITH-SA-1 株により生産される蛍光物質は、数平均分子量が 7.2 kDa で Ex=365、Em=498 nm の蛍光スペクトル示す物質であり、NMR、FT-IR 分析等からその分子内にベンゼン構造を有さないことが示されている。一般に有機蛍光物質は剛直な平面構造とπ電子共役系の供給源として分子内にベンゼン環を有しているが、上記結果は、本蛍光物質が学術的に説明のつかない希少な特徴を有していることを示唆している(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng.2015)。

本発見以来、われわれは本蛍光物質(以下 NPASFA)の構造の検討を試みており、その過程で、SYAL の下流の代謝産物である 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)とトリプトンを反応させることで、同様の性質を有する蛍光物質が生産されることを見出した(Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2016)。この結果は、より単純化した系でも同様の蛍光物質が生産されることを意味しており、また、有機蛍光物質に非ベンゼン系の物質群が存在することを示唆した。これらの詳細を明らかにするため、本研究では、非バイオプロセスによる NAPSFA の各種生産条件を検討した。

【結果と考察】

トリプトンの主要成分は、カザミノ酸、カゼインダイジェスト、ラクトアルブミン水解物であることから、これらを個別に 3-MGA と反応させ、その蛍光スペクトル、蛍光強度を検討した。その結果、供試した全ての条件で Ex=370、Em=510 nm 近辺の蛍光スペクトルを有する蛍光物質が生産された。これは、ITH-SA-1 株やトリプトン由来の蛍光物質とそのスペクトルが類似していた。この中で、カゼインダイジェスト由来の蛍光物質が最も強度が高かったことから、以降の実験を行った。

カゼインダイジェストは、核酸やペプチド、アミノ酸等と無機物の混合物であることから、この中でまず初めにアミノ酸に注目し、上記と同様の検討を行った。これまでに合わせて 15 種類のアミノ酸と 3-MGA との反応を検討した結果、リジンとアルギニンで蛍光物質の生産が確認されたが、それらの蛍光スペクトルは少し長波長側にシフトしていた。現在、より蛍光スペクトルの近いサンプルを生産させるため、ペプチド類の検討を行っている。

lignin, organic fluorescent substance, sustainable chemistry

発表責任者：岩淵　範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A12a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A12 会場

市販牛乳酵素分解物からの有機蛍光物質生産について

Production of oraganic fluorescent substances from hydrolysates of commercial milk

○廣川 侑美[1]、大槻 崇[1]、岩淵 範之[2]、松藤 寛[1] ([1]日大・生資科・食生、[2]日大・生資科・応生)
○Yumi HIROKAWA[1], Takashi OTSUKI[1], Noriyuki IWABUCHI[2], Hiroshi MATHUFUJI[1] ([1]Dept of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon Univ., [2]Dept of Applied Biological Science, Nihon Univ.)

【目的】我々は、リグニン及び低分子リグニン類を、微生物を用いたバイオプロセスにより高付加価値物質へ変換する取組みを行っている。この中で、シリンガアルデヒドの代謝物である 3-*O*-メチルガレート(3-MGA)が培地中の有機物と反応して有機蛍光物質(NAPSFA)を生成すること、培養時の窒素源として利用されるトリプトン(カゼイン酵素分解物)を添加すると NAPSFA を効率よく生成すること、非バイオ系で 3-MGA とトリプトンを混合するだけでも NAPSFA を生成することを見出した。3-MGA はリグニンもしくは低分子リグニンから供給可能であることから、その相手方となるペプチド類を食品廃棄物中のたんぱく質に求めることで、食品廃棄物の再資源化が可能となることが考えられた。そこで、本研究では市販牛乳を対象とし、NAPSFA 生成の最適条件について検討を行った。
【方法】3-MGA と 1%たんぱく質分解物水溶液を混合後、HCl または NaOH 水溶液で pH8 に調整し、28℃で 2 日間振とうした。その後、分光蛍光光度計で 3 次元蛍光スペクトルを測定し、最大励起波長及び最大蛍光波長での蛍光強度から反応溶液中の NAPSFA の生成度合を見積もった。
【結果及び考察】まず、トリプトンを用いて、3-MGA との反応による最適 NAPSFA 生成条件について検討した。結果、反応 pH は中性～弱塩基性下で NAPSFA の生成が最大となり、反応温度は室温～低温下の方が緩やかであるが安定的に蛍光物質が生成することが判明した。また、3-MGA とトリプトンの混合液に、高濃度(終濃度 1%または 0.1%)の糖、アミノ酸、アミンを共存させたところ、糖や多くのアミノ酸、アミンは NAPSFA 生成を抑制しなかったが、システインは生成を強く抑制した。アスコルビン酸やカテキンも NAPSFA 生成を抑制したことから、高濃度の抗酸化物質の存在は NAPSFA 生成反応を阻害することが判明した。次いで、市販カゼインのペプシン、キモトリプシン、トリプシン、パンクレアチン分解物を調製し、これと 3-MGA を反応させたところ、いずれの分解物からも蛍光が確認された。しかし、トリプトン(カゼインのパンクレアチン分解物：調製条件は不明)と比較すると、その蛍光強度は弱く、酵素分解条件の最適化が必要であると考えられた。パンクレアチンの添加量並びに反応時間について検討したところ、蛍光生成は酵素添加量や反応時間に依存し、0.04w/w%添加、6 時間の分解条件で、ほぼトリプトンと同様の蛍光生成が認められた。そこで、市販牛乳を用いて、pH 調整にてカゼイン沈殿物を得、これをパンクレアチンで分解後、3-MGA と反応させたところ、NAPSFA と類似した蛍光物質の生成が確認された。ラクトアルブミンのパンクレアチン分解物からも蛍光物質生成が認められることから、現在最適分解条件について検討中である。

organic fluorescent substance, milk, food waste

講演番号：3A12a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A12 会場

糖質に依存しないリグニン由来フェノール類からの *cis,cis*-ムコン酸生産

Sugar-free *cis,cis*-muconic acid production from lignin-related phenols

○杉田 晴佳[1,3]、畑村 美波[1,3]、高橋 健司[2,3]、上村 直史[2,3]、政井 英司[2,3]、園木 和典[1,3]（[1]弘前大・農学生命、[2]長岡技大・生物、[3]JST-ALCA）
○Haruka SUGITA[1,3], Minami HATAMURA[1,3], Kenji TAKAHASHI[2,3], Naofumi KAMIMURA[2,3], Eiji MASAI[2,3], Tomonori SONOKI[1,3] ([1]Agri. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., [3]JST-ALCA)

【目的】*cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) は多様なポリマー原料へと展開できる基幹化合物であり、これまでに糖質を原料とした生産方法が提案されてきた。しかし糖質の利用は、食糧やバイオプラスチック、セルロースナノファイバー等の原料としての需要と競合し、将来的には価格の高騰が懸念される。我々はこれまでに、糖質への依存度を減らすため、草本系・木質系バイオマス由来のリグニンを ccMA 生産の原料として利用することに着目し、リグニン由来のフェノール類から ccMA を生産できることを報告してきた[1),2)]。これらの方法では、ccMA 生産源としてリグニン由来フェノール類を利用するが、細胞の増殖源には糖質を利用しなければならなかった。そこで本研究では、さらに糖質への依存度を低減するために、リグニン由来フェノール類のみを炭素源として増殖し、ccMA を生産する微生物株の作出を検討した。

【方法と結果】リグニン由来フェノール類だけを利用し、増殖・ccMA 生産を可能にするために、ccMA の合成前駆体であるプロトカテク酸 (PCA) を ccMA に変換するルートと、PCA 3,4-dioxygenase (PcaHG) を経て増殖源として利用するルートに分配させることに着目した。*pcaHG* と ccMA cycloisomerase 遺伝子を破壊した *Pseudomonas putida* IDPC 株に、ラクトースプロモーター配列の制御下に連結した PCA decarboxylase 遺伝子 (*aroY*)と *pcaHG* を組込み (IDPC/pTS110 株)、G-リグニンモデルであるバニリン酸 (VA)、H-リグニンモデルである *p*-ヒドロキシ安息香酸 (HBA)、またはそれらの混合物を炭素源とした増殖能と ccMA 生産能を評価した。IDPC/pTS110 株はすべての条件において増殖し、ccMA を生産することができた (収率< 20 wt%)。ccMA 収率をさらに向上させるために、PCA を増殖源として利用する代謝に関わる PcaHG に着目した。PcaHG は酸素添加酵素であることから、反応液中の溶存酸素濃度 (DO) または通気量 が ccMA 収率に影響すると予測した。休止菌体反応から、DO または通気量が制限される条件下で ccMA 収率が向上することを見出した。より厳密に DO や通気量の制御が可能なミニジャーファーメンターを用いて ccMA 生産試験を実施した結果、DO を 5～10%に制御することで、30 wt%以上の収率で ccMA を生産できることを明らかにした。

本研究は JST 戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の支援を受けて実施した。

1) 菊地ら、第 69 回日本生物工学会大会 (2017). 2) 東ら、第 69 回日本生物工学会大会 (2017).

lignin, *cis,cis*-muconic acid, *Pseudomonas putida*

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3A12a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A12 会場

Halomonas sp. KM-1 株による好気培養条件下でのオキサロ酢酸の効率的な分泌生産
Efficient production and secretion of oxaloacetate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions

○河田 悦和[1]、盤若 明日香[2]、西村 拓[2]、松下 功[2]、坪田 潤[2] ([1]産総研、[2]大阪ガス)
○Yoshikazu Kawata[1], Asuka Hannya[2], Taku Nishimura[2], Isao Matushita[2], Jun Tsubota[2] ([1]AIST, [2]OSAKA GAS Co.)

（概要）我々は好塩好アルカリ・*Halomonas* sp. KM-1 株を用いて、化成品中間体を生産する研究を実施している。KM-1 株は、培養に酵母エキス等を要せず、Ｃ５糖や廃グリセロールを資価し、中程度の高塩濃度、pH9-10 で好適に生育するため、雑菌の混入が生じにくく、大量のエネルギーが必要な培地などの滅菌が不要である。昨年度本大会などで１)、菌体中にバイオプラスチックＰＨＢ合成を促進する過程で、ＰＨＢ合成が抑制され、著量のピルビン酸を分泌することを報告したが、最近さらに、好気的な条件でオキサロ酢酸のみを効率的に分泌生産する条件を見出したので報告する。
（方法と結果）炭素源としてグルコース、窒素源として硝酸ナトリウムを用い、37℃で培養し、菌体および培地組成を分析した。従来の条件では、著量のピルビン酸を分泌したが、培養の途上、対数増殖期もしくは培養当初から培地に含まれる塩濃度を 1.0M 程度に上昇させると、ピルビン酸の生産が抑制され、代わりに 39g/L 以上のオキサロ酢酸を分泌生産することを見出した。
オキサロ酢酸の大量生産についてはほとんど報告がなく、また、ハロモナス菌において、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸をはじめ、すでに数種類の有機酸の生産を報告しており、今後、ハロモナス菌を含め好塩・好アルカリ微生物による有機酸の生産は、その生理メカニズムの観点からも興味深いものと思われ、現在その生産メカニズムについて、代謝物の変化について検討を行っている。

1) A Hannya, T Nishimura, I Matsushita, J Tsubota, Y Kawata (2017) Efficient production and secretion of oxaloacetate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions. AMB Express, 7(1):209

Halomonas, oxyacloacetate

講演番号：3A12a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A12 会場

メタノール資化性酢酸菌 *Acidomonas methanolica* のグリセリン酸生産能
Ability of *Acidomonas methanolica* to produce glyceric acid from glycerol
○佐藤 俊[1]、羽部 浩[2] ([1]産総研・機能化学、[2]産総研・環境管理)
○Shun Sato[1], Hiroshi Habe[2] ([1]ISC, AIST, [2]EMRI, AIST)

【目的】 D-グリセリン酸（D-GA）は、植物の微量成分として見出された天然の有機酸で、ラットにおける肝臓のエタノール代謝促進効果やヒト繊維芽細胞の賦活化作用等の生物活性が報告されている[1,2]。D-GA の生産方法として、酢酸菌によるグリセロールの酸化発酵法が知られており、100g/L 以上の GA を生産することが可能である[3]。また、菌株の選択により GA の光学純度を制御できることが明らかになっており、*Acetobacter tropicalis* ではエナンチオマー過剰率（ee）99%の D-GA を、一方で、*Gluconobacter frateurii* では 73%ee の D-GA が得られる[3]。しかし、ee が 50%以下の D-GA を生産する酢酸菌は知られていない。本研究では、GA の生産が報告されていなかったメタノール資化性の酢酸菌である *Acidomonas methanolica* での GA 生産を検討し、生産条件の検討および得られた GA の ee を評価したので報告する。
【方法と結果】 *A. methanolica* NBRC104435 は、0.5%(w/v)酵母エキス、0.5%(w/v)ポリペプトン、0.1%（w/v）$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ に炭素源（グリセロール、メタノール）を添加した培地で 30℃、4 日間振とう培養を行った。培養液中の炭素源および有機酸は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量し、菌体の増殖は OD600 で評価した。また、培養液中に蓄積された GA は晶析法によりカルシウム塩として精製し、精製物のエナンチオマー過剰率はキラルカラムを用いた HPLC 測定により評価した。
A. methanolica はグリセロール、メタノールそれぞれを炭素源として生育し、グリセロールでは 1%(w/v) 、メタノールでは 1-3%(v/v) で良好に生育した。また、グリセロールを炭素源とした場合には GA が培養液中に蓄積されることが分かり、1%(w/v) グリセロールから 4 日間で 4.9 g/L の GA が生産された。一方、グリセロールを含む培地にメタノールを添加すると菌の生育および GA 生産量が増加し、3%(w/v) グリセロールと 1%(v/v) メタノールを培地に添加した結果、GA 濃度が 12.1 g/L に達した。この条件で生産された D-GA の ee を評価すると 44.2%であり、これまで報告されている酢酸菌とは異なる光学純度の GA が生産されていることが分かった。

1) Eriksson et al., Metabolism, **2007**, *56*, 895. 2) Sato et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **2014**, *78*, 1183. 3) Habe et al., Appl. Environ. Microbiol., **2009**, *75*, 7760.

glyceric acid, *Acidomonas methanolica*, glycerol

講演番号：3A12a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A12 会場

中度好塩性細菌ハロモナスにおける不揮発性腐敗アミンからのエクトイン生産
Ectoine production from putrefactive non-volatile amines in the moderate halophile *Halomonas elongata*

○仲山 英樹、河本 亮（長崎大院水環）
○Hideki NAKAYAMA, Ryo KAWAMOTO (Nagasaki Univ.)

中度好塩性細菌ハロモナス（*Halomonas elongata*）は、グルコース、キシロース、グリセリン等のバイオマス由来の炭素源の資化性に優れているため、バイオマス原料から高機能性素材であるエクトイン等のファインケミカルを発酵生産する細胞工場として期待される。

本研究室では、タイ東北部の塩類集積土壌で分離された OUT30018 株と非常に近縁のオランダ領ボネール島の天日塩製造所で分離された DSM2581^{T} 株との比較ゲノム解析により、OUT30018 株にのみ存在する CDS 群の中に、芳香族炭化水素である 4-ヒドロキシフェニル酢酸（4-HPA）分解に関わる遺伝子群が存在することを見出した。そこで本研究では、タンパク質系バイオマスの腐敗により生じる不揮発性腐敗アミンであるチラミンの分解に 4-HPA 分解経路が関与していることに着目し、4-HPA 分解遺伝子群が OUT30018 株内で実際に機能しているか検証すると共に、不揮発性腐敗アミンであるチラミンを窒素源かつ炭素源としてエクトインを高効率に発酵生産する細胞工場の開発を目的とした。

OUT30018 株と DSM2581^{T} 株の培養には、炭素源または窒素源を含まない改変 M63 無機塩培地を基本液体培地とし、適宜、塩化ナトリウム（NaCl）と炭素源および窒素源を添加して用いた。培地中の NaCl 濃度は 0.5 M または 1.5 M とし、単一炭素源としてグルコースおよび 4-HPA、窒素源かつ炭素源としてチラミンを適当量添加し、37℃で 1 晩前培養した濁度（OD_{600}）を 0.05 に調整した培養液を、新たな液体培地に 5%植菌して培養を行い、OD_{600} の値を指標にして各炭素源・窒素源の資化実験を行った。

4-HPA を単一炭素源として添加した場合では 4-HPA 濃度が 2.5～30 mM の条件で、チラミンを単一窒素源かつ炭素源として添加した場合では、チラミン濃度が 10～50mM の条件で OUT30018 株の増殖が確認された。しかし DSM2581^{T} 株では、いずれの培養条件でも増殖しなかった。以上の結果から、OUT30018 株ゲノム上の 4-HPA 分解系遺伝子群が機能的に発現していることが示された。さらに、NaCl 濃度を 0.5M または 1.5 M とした培養条件を設定し、NaCl の濃度変化が OUT30018 株の増殖に与える影響を調査した結果、1.5M NaCl の条件で培養した方が定常期における最終に到達した濁度 OD_{600} 値が高かった。これは塩濃度が高いほど細胞内に蓄積されるエクトイン量が増加することで、定常期における培地成分が枯渇する飢餓ストレスや活性酸素種による酸化ストレス等の環境ストレスに菌株が適応したためであると考えられる。

今後は、OUT30018 株を細胞工場として活用することにより、不揮発性腐敗アミンを含むタンパク性廃バイオマスを原料とした高効率なエクトインの発酵生産系の構築を目指す。

Halomonas elongata, putrefactive non-volatile amines, Ectoine production

発表責任者：仲山英樹（nakayamah@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：3A12a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A12 会場

Enhanced alkylresorcinol (ARs) production in cyst of Azotobacter vinelandii A81 by culturing with surfactants

○ RAHUL JOG[1], SHIGERU HIRAMOTO[2], YASUSHI OHGO[2], MASAAKI MORIKAWA[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Nisshin Pharma Inc.)

Azotobacter vinelandii is a Gram negative, obligate aerobic, heterotrophic, free-living diazotroph with pleomorphic (rod or coccoid), large (2-5 μm) cells having peritrichous flagella. It forms 'cyst': a dormant, non-motile, encapsulated structure to survive harsh conditions. In mature cyst, phenolic lipids such as alkylresorcinols (ARs) and alkylpyrones (APs) replace in part of membrane phospholipids to increase the structural stability. ARs are valuable compounds with wide application in pharmaceutical (anti-cancer) and cosmetic (anti-aging, anti-acne, hair treatment) industries, which are naturally accumulated in plant sources such as wheat bran at 0.2% w/w. *Azotobacter vinelandii* accumulates ARs at 2% w/w of cyst dry mass, however, higher production yield and more efficient extraction are needed for industrial production. In this study, the effect of various chemical (anionic: SDBS, non-ionic: tween-20, tween-80 and cationic: OsbanS) surfactants on ARs production in *Azotobacter vinelandii* A81 was examined. It was found that addition of 0.1% tween-20 to the growth medium significantly increased ARs in cyst by 3 times. Moreover, total yield of cyst formation was also improved by 1.5 times as compared to control without surfactants. These results are expected to open a new avenue for cheap and environment friendly industrial production of ARs from microbial sources.

alkylresorcinol, Azotobacter vinelandii, surfactants

発表責任者：Masaaki Morikawa（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A12a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A12 会場

ソルガムにおける亜テルル酸吸収と特異的還元系の解析
Uptake and reduction of tellurite in *Sorghum bicolor*
○渡部 翔太[1]、中條 滉叡[2]、武田 徹[1,2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Shota WATABE[1], Hiroaki CHUJO[2], Toru TAKEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

【目的】第 16 族元素のひとつであるテルル（Te）は、太陽光発電セルや CD-RW など様々な産業製品に欠かせないレアメタルのひとつであり、病原体の特定などといった工業以外の分野においても需要が高まっている。それに伴い、環境中に排出される水溶性のテルル酸および亜テルル酸に起因する新たな環境汚染問題が懸念されている。テルル酸（Te[VI]）および亜テルル酸（Te[IV]）はいずれも高い毒性を有し、多くの生物種に対して重篤な障害をもたらす。それゆえ、生物による Te の安全かつ効率的な回収・リサイクル技術が注目され始めている。このような状況下、微生物による Te 回収技術が最近報告されたが、植物を用いた例はほとんどない。植物において、Te は硫黄と同族であることから、根の硫酸トランスポーターにより取り込まれ硫黄同化経路で代謝されると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。そこでテルルと同族のセレンを蓄積する植物で Te[IV]を吸収することが判明している単子葉植物のソルガムにおける、Te[IV]のテルル元素への還元系について検討した。
【方法・結果】ソルガム種子は液肥を十分に含んだバーミキュライトに播種し、人工気象室（明期 14 時間（240 μmol/m^2/s ：24°C）／暗期 10 時間（20°C））で 7 日間栽培後、50%ムラシゲ・スクーグ混合塩類を含む水耕液に移植し、さらに 7 日間栽培した。Te 添加群は、水耕液に移植の際、5～100 μM Te[IV]を添加して栽培した。すべての Te 添加群の根において、Te[IV]の取り込みが認められたが、地上部では 100 μM 添加群以外ではほとんど Te[IV]取り込みが認められなかった。生育に及ぼす影響を地上部および根の長さと乾燥重量でそれぞれ評価した。その結果、20 μM 添加群までは、地上部および根ともに生育はほとんど影響を受けていなかったが、100 μM 添加群ではいずれも顕著な生育阻害が認められた。亜硫酸還元系での Te[IV]還元活性を調べたところ、コントロールおよび Te 添加群の地上部および根のいずれにおいても活性は認められなかった。一方、NADH を電子供与体とする Te[IV]還元活性はいずれの植物体からも検出された。地上部および根の Te[IV]還元活性は、高濃度 Te 添加群において有意に増加していた。Te[IV]還元活性を Native PAGE 後の活性染色法により評価したところ、地上部および根のそれぞれに少なくとも 5 種類の Te[IV]還元酵素が存在することが明らかになった。泳動の Rf 値より、これら 5 種類のうち 3 種類は同じタンパク質であることが推測された。現在、Te[IV]還元活性を有するタンパク質の同定を試みている。

tellurite, *Sorghum bicolor*, rare metal

発表責任者：武田徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A12p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A12 会場

ニトロゲナーゼを高発現する鉄酸化細菌を用いた微生物電気化学的アンモニア生産

Bioelectrochemical production of ammonia by an engineered iron-oxidizing bacterium

○山田 祥平、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Shohei YAMADA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】アンモニアは化学肥料の主要成分であり、近年の人口増加に伴う食糧不足を補うために重要な物質である。現在アンモニアは高温高圧条件下の反応条件を必要とするハーバー・ボッシュ法（エネルギー多消費型プロセス）によって工業的に合成されている。そのため、温和な条件下でアンモニアを合成するための手法の一つとして、窒素固定微生物を用いたアンモニア生産が検討されている。その中で、我々は窒素固定可能な独立栄養細菌として好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 株に着目した。ATCC23270 株はニトロゲナーゼを持つために大気中の窒素を固定して生育できる。さらに、電気化学培養法（電極から還元力を供給する培養法）により高密度に培養できることが報告されており、本株を用いれば、空気と電気を用いた安価で高効率なアンモニア生産が可能であると期待される。しかし、一般に窒素固定には多くの還元力とエネルギーが必要となるため、窒素固定制御遺伝子は厳密に制御されており、微生物は自身の生育に必要な量以上のアンモニアを合成しない。そこで本研究では、ATCC23270 株の窒素固定能を高めるために、ニトロゲナーゼ遺伝子の転写活性化因子（NifA）の過剰発現株（*nifA*-OE 株）を作製し、空気と電気からのアンモニア生産の高効率を目指した。

【方法・結果】*A. ferrooxidans* ATCC23270 株による *nifA* 過剰発現株（*nifA*-OE 株）を作製し、ニトロゲナーゼ活性の増強を図った。培地中に窒素源である NH_4^+を添加しない条件下で *nifA*-OE 株における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した結果、野生株と比較してニトロゲナーゼ遺伝子を含む多くの窒素固定制御遺伝子の発現が大幅に上昇していた。また、アセチレン還元法により *nifA*-OE 株ではニトロゲナーゼ活性が増加していることも示された。そこで、*nifA*-OE 株を電気化学培養し、アンモニア合成を試みた。野生株では培地中に NH_4^+の蓄積が確認されなかったのに対して、*nifA*-OE 株では有意なアンモニアの蓄積が確認された。さらに NH_4^+合成量を促進させるために、NH_4^+の同化を担うグルタミン合成酵素を阻害する L-methionine sulfoximine を添加し、細胞外に NH_4^+の分泌を促した。その結果、野生株、*nifA*-OE 株ともにアンモニア生産速度が顕著に増加した。 1 週間後のアンモニア蓄積量を野生株と *nifA*-OE 株で比較すると、*nifA*-OE 株では約 1.5 倍のアンモニアが蓄積していた。これらの結果は、*nifA* 遺伝子の過剰発現によって *A. ferrooxidans* の窒素固定能力が大幅に向上し、これにより大気中の窒素と電気からのアンモニア生産が高効率化されることを示している。

Acidithiobacillus ferrooxidans, bioelectrochemical system, ammonia production

発表責任者：山田祥平（s126210@toyaku.ac.jp）

講演番号：3A12p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A12 会場

高電圧バイオ電池構築のための酸化還元電位シフトを目指した超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの遺伝子改変

Directed evolution of multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon for biofuel cells

○高村 映一郎[1]、坂元 博昭[2]、里村 武範[3,4]、櫻庭 春彦[5]、大島 敏久[6]、末 信一朗[2,3,4] ([1]福井大学院・工・総合、[2]福井大学院・工・繊維、[3]福井大学院・工・生物応用化、[4]福井大学・生命セ、[5]香川大農、[6]大阪工大)

○ Eiichirou TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[2], Takenori SATOMURA[3,4], Haruhiko SAKURABA[5], Toshihisa OHSHIMA[6], Shin-ichiro SUYE[2,3,4] ([1]Dept. Adv. Interdiscip. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [5]Kagawa Univ., [6]Osaka Inst. Tech.)

［背景］

酵素をエネルギー変換素子とするバイオ電池（Biofuel cell:BFC）は環境負荷のない次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や電池電圧の低さの問題があるため、未だ実用化には至っていない。本研究では電池電圧の低さの改善を目指している。BFC の電池電圧は、主に酵素およびメディエータの酸化還元電位に依存する。我々は、長期安定性を有する超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) を BFC のカソード触媒として用いてきた。しかし、McoP は酸化還元電位の低い MCO（+0.37 ~ +0.45 V（vs. SHE））に分類されるため、BFC を構築した際の電池電圧の低さが問題であった。本研究では、McoP の酸化還元部位である T1Cu の軸配位子（Met）を Leu もしくは Phe へ置換することで McoP の酸化還元電位の正側へのシフトを試みた。

［実験］

McoP の 442 番目の Met を遺伝子工学的に Leu もしくは Phe へ置換した変異型 McoP（M442L, M442F）は組換体より精製した。ピレンカルボン酸を修飾した多層カーボンナノチューブと各精製酵素の混合溶液を電極へ滴下・風乾することで各 McoP 修飾電極を作製した。電気化学測定は、作製した各 McoP 修飾電極を作用極とする 3 電極方式によりサイクリックボルタンメトリー(CV)を行い、各 McoP の酸化還元電位を評価した。

［結果と考察］

McoP は 50˚C 以上の高温において活性を示すため、50˚C での CV による酸化還元電位の評価を行った結果、酸化還元電位は野生型、M442L、M442F の順に 426、555、544 mV（vs. SHE）であった。2 つの変異体ともに野生型と比較して 100 mV 以上酸化還元電位が正側へシフトした。これは、電子吸引性基を有する Met が Leu、Phe に置換されることで T1Cu の酸化状態が不安定になるためである。M442F と M442L を比較すると、両者の酸化還元電位はほぼ同じであった。一方、野生型が 95˚C まで安定であるのに対して、M442F の熱安定性が 80˚C まで低下していることから、嵩高い側鎖を有する Phe へ置換されることで McoP の熱安定性に寄与する構造への影響が大きくなってしまった可能性が考えられる。今後、得られた変異体をカソード触媒として用いてバイオ電池の構築を行い、酵素の酸化還元電位が電池電圧に与える影響を検討していく。

biofuel cell, multicopper oxidase, redox potential

講演番号：3A12p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A12 会場

電極-酵素界面における異種間電子移動の距離依存性解析

Distance dependence analysis of electron transfer between electrode and enzyme

○鈴木 治人[1]、中村 卓登[2]、高村 映一郎[3]、坂元 博昭[2,5]、里村 武範[4,5]、櫻庭 春彦[6]、大島 敏久[7]、末 信一朗[2,4,5]([1]福井大学・工・生物応用化、[2]福井大学院・工・繊維、[3]福井大学院・工・総合、[4]福井大学院・工・生物応用化、[5]福井大学・生命セ、[6]香川大農、[7]大阪工大)

○ Haruto SUZUKI[1], Takuto NAKAMURA[2], Ei-ichiro TAKAMURA[3], Hiroaki SAKAMOTO[2,5], Takenori SATOMURA[4,5], Haruhiko SAKURABA[6], Toshihisa OHSHIMA[7], Shi-ichiro SUYE[2,4,5] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Eng., Univ. Fukui,, [2]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Adv. Interdiscip. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui,, [5]es. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [6]Kagawa Univ., [7]Osaka Inst. Tech)

[緒言]

酵素を触媒とするバイオ電池は環境負荷が小さいなどの利点から、バイオマスの有用な利用法の一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や出力密度の問題から、実用化には至っていない。本研究室では、長期安定性を有する超高熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来の Multicopper oxidase (McoP)に着目してカソードデバイスを作製してきた。MCO は T1、T2、T3 に分類される 3 種の銅イオンの活性中心を持ち、T1Cu 部位で電子を受け取り、T2/T3Cu 部位で酸素を還元することが知られている。これまでに McoP の C 末端に His-tag を導入した McoP His を作製し、これを Ni を配位させたニトリロ三酢酸(Ni-NTA)と自己組織化単分子膜(SAM)を介して金電極上に配向固定させることで酵素-電極間の電子伝達効率の向上に成功している。本研究ではさらに His-tag の C 末端側に Cys 残基を導入(McoP His Cys)して金電極への酵素分子の直接的な配向固定を試み、酵素-電極間の距離を縮めることでデバイス性能の向上を目指した。

[方法]

McoP His をコードするプラスミドを鋳型とし、Inverse PCR を行うことで His-tag の末端にシステインを導入したプラスミドを構築し、大腸菌を形質転換し、組み換えタンパク質を得た。

金電極上に 1.0 mg/ml McoP His Cys を 10 µl 滴下し、室温で 1 時間静置させ、McoP His Cys 配向固定化電極を作製した。それぞれの McoP 固定化電極について、3 電極方式にてサイクリックボルタンメトリー(CV)にて電気化学的性質を評価した。

[結果及び考察]

McoP His Cys 及び McoP His を各々の方法で固定化した各 McoP 配向固定化電極の CV 測定を行ったところ、McoP His Cys 電極では McoP His 電極に比べて酸素の還元開始電位が 0.1V 正側へシフトし、電流密度は 2 倍となった。これは McoP His Cys の持つ SH 基と金電極間の Au-S 結合により、直接金電極上に McoP を固定化することで、酵素-電極間の距離が縮まり、T1Cu 部位がより電極に近づいたことによる効果と考えられる。

biofuel cell, direct electron transfer, multicopper oxidase

講演番号：3A12p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A12 会場

バイオ電池電極への酵素固定化のためのカーボンナノチューブ結合ペプチドの応用

Application of carbon nanotube binding peptide for enzyme immobilization on biofuel cell electrode

○渡辺 好一[1]、殿岡 愛菜[2]、坂元 博昭[2,4]、里村 武範[3,4]、櫻庭 春彦[5]、大島 敏久[6]、末 信一朗[2,3,4]
([1]福井大学・工・生物応用化、[2]福井大学院・工・繊維、[3]福井大学院・工・生物応用化、[4]福井大学・生命セ、[5]香川大農、[6]大阪工大)
○Koichi WATANABE[1], Aina TONOOKA[2], Hiroaki SAKAMOTO[2,4], Takenori SATOMURA[3,4], Haruhiko SAKURABA[5], Toshihisa OHSHIMA[6], Shin-ichiro SUYE[2,3,4] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [5]Kagawa Univ., [6]Osaka Inst. Tech.)

[諸言]

酵素の触媒反応により、有機資源から電気エネルギーを得るバイオ電池は、バイオマスの有用な利用法として注目されているが、一方で実用化に向けて、酵素自体に起因する長期安定性や、出力の向上が求められている。バイオ電池の出力向上のためには、電極界面における酵素反応と電子移動を高効率に達成できるような配向制御が必要とされている。本研究では、優れた導電性と大きな比表面積を有するカーボン材料へ酵素を高配向に固定したデバイスの構築を目指した。カーボン材料に特異的に結合するカーボンナノチューブ結合ペプチド(Carbon nanotube binding peptide)に注目し、超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来のマルチ銅オキシダーゼ(McoP)の C 末端へ CBP を導入した McoP-CBP を作成した。McoP-CBP をカーボンナノチューブ(CNT)表面へ高配向に固定化し、電気化学特性の評価を行い、その効果を明らかにした。

[方法]

・McoP-CBP 発現ベクターの構築

McoP をコードする遺伝子 PAE 1888 断片を鋳型とし、PCR を行って、PAE1888-CBP フラグメントを得た。次に、線状化した pET11a の相補鎖を一部有する PAE1888-CBP 断片を得た。この断片およびベクターを用いて、In-Fusion クローニングを行い、McoP-CBP 発現ベクターを得た。

・McoP-CBP/単層カーボンナノチューブ(SWCNT)複合体の作製および電気化学的評価

野生型 McoP(McoP-WT)または McoP-CBP を SWCNT と混合し、3 時間超音波処理することにより CNT 表面へ酵素を結合させた。得られた McoP-WT/SWCNT 複合体および McoP-CBP/SWCNT をグラッシーカーボン電極上に滴下し、次にナフィオンを滴下して複合体を電極上に固定化した。

[結果と考察]

CBP を導入した McoP は、酵素活性の低下は見られなかった。CV 測定の結果では、McoP-WT/SWCNT と McoP-CBP/SWCNT で酸素の還元開始電位に差が見られた。McoP-WT/SWCNT では+0.3 V vs. Ag/AgCl で酸素の還元が開始され、酸素の還元波が確認された。一方、McoP-CBP/SWCNT では酸素の還元開始電位は +0.4 V vs. Ag/AgCl であった。これは CBP を介した McoP 固定により、McoP 中の酸化還元部位となる T1Cu との電子移動が円滑に行われたためであると考えられる。

biofuel cell, carbon nanotube, hyperthermophilic archaeon

講演番号：3A12p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A12 会場

電極を電子供与体とした *Shewanella oneidensis* MR-1 株の増殖

Electron supply from low-potential electrodes stimulates the aerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR-1

○廣瀬 篤弥、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Atsumi HIROSE, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】

Shewanella oneidensis MR-1 株は異化的金属還元菌であり、細胞外の電極に直接電子伝達が可能なこと、遺伝子操作が容易であることから微生物燃料電池（MFC）におけるモデル細菌として広く研究されている。一方、MR-1 株は低電位電極から電子を受け取ることも可能であり、微生物電気合成（MES）への利用も期待されている。これまでの研究において、MR-1 株の細胞内に取り込まれた電子は少なくとも内膜のキノンまで伝達されることが明らかとなっている。しかしそれ以降の電子伝達経路は不明であり、細胞質内の電子伝達体（NADH やフェレドキシン）が還元されるのか、また電極からの電子供給によって増殖に必要なエネルギーを獲得できるのかどうかといった点に興味が持たれた。そこで本研究では MR-1 株が電極から電子を受容する際の電子伝達経路とエネルギー獲得経路を解明し、MR-1 株を MES に利用するための基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法と結果】

MR-1 株を低電位電極存在下で培養し、電極からの電子供給によって増殖可能かどうかを検証した。従属栄養細菌である MR-1 株が増殖するためには、電子供与体と電子受容体に加え、炭素源となる有機物となる。そこで本研究では電極を電子供与体、酸素を電子受容体とし、炭素源としてペプトンと酵母エキスを添加した実験系を構築し、MR-1 株の増殖の有無を調べた。この際、低電位電極表面で発生する水素の菌体増殖への影響を除くため、水素酸化を触媒するヒドロゲナーゼの欠損株（Δ*hyaB* 株）を使用して実験を行った。Δ*hyaB* 株をペプトンと酵母エキスを加えた三電極二槽式電気化学セル（作用極電位: –0.6 V vs. Ag/AgCl）に植菌し、空気をバブリングしながら運転を行った。電流値が落ち込んだところで菌体を回収し、開回路条件と電気化学セル内のタンパク質量を比較した結果、電位を印加した条件において有意にタンパク質量が増加していた。この結果から、MR-1 株は電極から電子を受容して酸素を還元する過程で ATP や還元力（NADH 等）を産生し、これらを利用して増殖可能であることが示唆された。また本実験により MR-1 株は自然環境中においても細胞外に存在する固体物質から電子を受け取り、酸素還元を行うことによってエネルギーを獲得している可能性が考えられた。現在細胞外電子伝達やエネルギー代謝に関与する遺伝子破壊株を用いて同様の実験を行い、電子受容経路とエネルギー獲得経路の解明を行っている。

Shewanella oneidensis MR-1, bioelectrochemical system, electron uptake

講演番号：3A12p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A12 会場

FAD 依存性グルコース脱水素酵素の安定性に対する電解質の影響

The effect of electrolytes on the stability of FAD-dependent glucose dehydrogenase

○根本 美貴、安立 翼、椙原 和法、辻村 清也（筑波大数理物質科学）
○ Miki NEMOTO, Tsubasa ADACHI, Kazunori SUGIHARA, Seiya TSUJIMURA (Univ. of Tsukuba)

【目的】

高い触媒活性と基質特異性を併せ持ち、酸素を電子受容体としない FAD 依存性グルコース脱水素酵素(FAD-GDH)[1]のウェアラブル型バイオ燃料電池のアノードへの応用が期待されているが、高温での失活や長期使用での安定性が課題となっている。そこで本研究では、電池に高濃度で添加する電解質の酵素の安定性に対する影響を調査した。

【方法】

添加する電解質はホフマイスター系列[2]を参考に、カチオンはナトリウムイオン、カリウムイオン、アンモニウムイオン、テトラメチルアンモニウムイオン，アニオンには硫酸イオン、硝酸イオン、塩化物イオン、酢酸イオンを選択した。まず各電解質 500 mM を含むリン酸緩衝液(100 mM, pH 7.0)を調製した。この緩衝液に FAD-GDH(池田糖化工業、*Aspergillus terreus* 由来)を 6 μM となるように加えた酵素溶液を 50℃で 60 分間加熱処理を行った。加熱前後の酵素溶液にヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを加えてクロノアンペロメトリーを行い、得られた触媒電流値から加熱前後の残存活性を算出した。さらに硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムについては、電解質を含むリン酸緩衝液(100 mM, pH 7.0)を用いて酵素溶液を調製し、電解質濃度を 100、500、1000、1500、2000 mM と変化させ、60℃で同様の試験を行った。

【結果】

電解質を加えない 100mM リン酸緩衝液における 50℃で加熱後の FAD-GDH の残存活性は 45%であったが、電解質を添加することで安定性の向上が確認された。特に大きな安定化効果がみられたのはコスモトロピックなアニオンおよびカチオンで、ホフマイスター系列に従う結果となった。これは溶液中にコスモトロピックなイオンが存在することで、酵素の水和水がイオンとともに排除され、酵素がコンパクトな構造をとるためと考えられる[2][3]。また、添加する電解質濃度を変化させたところ、濃度依存的な安定性の向上が確認された。特に、1500 mM 以上の硫酸塩で著しく大きな安定化効果を得た。FAD-GDH を用いた電池の作動安定性の向上が期待できる。

【参考文献】

1. S. Tsujimura *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 654 (2006)
2. Z. Yang, *J Biotechnol,* **144**, 12 (2009)
3. K.D. Collins, *et al., Biophys. Chem.***128**, 95 (2007)

bio fuel cell, glucose dehydrogenase, stabilization

講演番号：3A12p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A12 会場

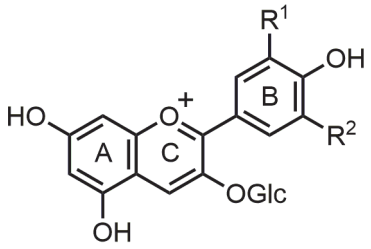
アントシアニンと助色素を共吸着させた色素増感太陽電池の研究

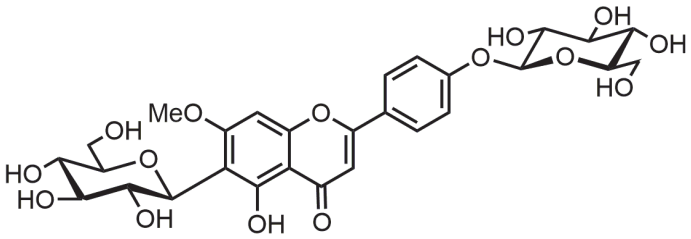
Study on dye sensitized solar cells co-adsorbed with anthocyanin and copigment

○酒井 勇輔[1]、尾山 公一[2]、若宮 淳志[3]、村田 靖次郎[3]、近藤 忠雄[1]、吉田 久美[1]([1]名大院情報学、[2]名大物国セ、[3]京大化研)
○Yusuke SAKAI[1], Kin-ichi Oyama[2], Atsushi Wakamiya[3], Yasujiro Murata[3], Tadao Kondo[1], Kumi Yoshida[1] ([1]Grad. Sch. info., Nagoya Univ., [2]RCMS, Nagoya Univ, [3]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

＜目的＞色素増感太陽電池（DSSC）の最大の特徴は、色素の選択によってカラフルなセルが得られるという点である。中でも、アントシアニン色素を用いた DSSC は、製造コストが安いこと、環境適合性が高いこと、赤～青紫の多彩な色をもつ特徴がある。我々はこれまでアントシアニジン 3-グルコシド及び合成したメチル化シアニジン類を用いて DSSC を作成し特性評価を行った[1]。今回、光変換効率の向上を目指し、助色素を共吸着させた DSSC を作成し、発電効率を測定した。
＜方法と結果＞アントシアニン色素として B 環の構造の異なる 4 種、コピグメントとしてツユクサ（*Commelina communis*）由来のフラボコンメリン(**5**)を用いた。酸化チタンを焼付塗装した FTO 基板を色素又は色素と助色素の溶液に浸し、DSSC を作成した。基板の反射スペクトルを測定したところ、吸収極大波長はコピグメントの共存によって長波長シフトした。今後、作成した基板の発電効率を評価する予定である。

表 1. DSSC に用いたアントシアニンと助色素、及び DSSC の色.





flavocommelin (**5**)

	R^1	R^2	λ_{max} anthocyanin	λ_{max} +copigment (10 eq.)
cyanidin 3-glucoside (**1**)	OH	H	540	546
delphinidin 3-glucoside (**2**)	OH	OH	538	538 (br)
petunidin 3-glucoside (**3**)	OMe	OH	543	564
malvidin 3-glucoside (**4**)	OMe	OMe	537	558

[1] Y. Kimura, et al, *J. Photochem. Photobiol., A* , **2017**, *335*, 230-238.

Natural DSSC, Anthocyanin, Copigment

講演番号：3A12p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A12 会場

液膜型硝酸イオンセンサーの開発と水耕栽培培養液および土壌中の硝酸イオンのモニタリング
Development of ion-selective electrode (ISE) liquid membrane nitrate ion sensor and on-site monitoring of nitrate ion
○中尾 英策、白井 理、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Eisaku NAKAO, Osamu SHIRAI, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】野菜の生育はさまざまな元素を必要としている。そのうち、窒素は収量に特に大きく関わるため、アンモニウムイオンや硝酸イオン(NO_3^-)を含む肥料が投与される。しかし、過度の施肥は生産物の品質を下げるおそれがある。また、土壌からの NO_3^-の流出による環境水の富栄養化をまねくとともに人体にまで影響を与えるおそれがある。したがって、土壌中の NO_3^-濃度を適切に制御することが重要である。そのため、NO_3^-のモニタリングとそれに基づいた濃度管理が必要となる。既存の NO_3^-の測定法としては吸光光度法、伝導度測定法などが存在するが、これらは試料の前処理を必要としその場での測定が困難であり、水分量や共存イオンの影響を受けるなどの課題が残る。本研究では、試料の前処理を必要とせず、長期間安定にモニタリングが可能となる液膜型 NO_3^-選択性電極 (NO_3^--ISE)の開発を試み、その特性を評価した。
【方法】NO_3^-センサー用電極の内部溶液として 5.0×10^{-2} M $AgNO_3$ と 5.0×10^{-2} M $Mg(NO_3)_2$ を含む内部溶液、NO_3^-感応膜として tetraheptylammonium nitrate ($[THpA^+][NO_3^-]$) および nitrophenyl octyl ether (NPOE) を含む polyvinyl chloride (PVC) 薄膜を用いた。外部参照電極(RE)として内部溶液に 0.05 M $MgCl_2$ および 2 M $MgSO_4$ を含む銀|塩化銀電極を用いた。なお、液絡部分には多孔質セラミックスを利用した。これらの RE と NO_3^--ISE を用いて、まず既知濃度の NO_3^-溶液で電位差を測定し、検量線を作成した。その後、水耕栽培養液中でのモニタリングなどの評価をした。
【結果】感応膜中の NPOE と PVC の重量比が 2:1、$[THpA^+][NO_3^-]$の含量を NPOE に対して 3 mg mL^{-1} とした場合に最も安定で応答特性のよい電極が作製できた。この NO_3^--ISE を用いて NO_3^-に対する検量線を作成したところ、NO_3^-の濃度が 1.0×10^{-5} ～1.0 M の範囲で傾きが約 50 mV $decade^{-1}$ の応答を示した。これは、試料溶液|感応膜間の界面電位差の変化で説明することができた。ISE の応答に対する共存イオンによる妨害の有無を調べたところ、SO_4^{2-}、CO_3^{2-}、HPO_4^{2-}、$H_2PO_4^-$、Na^+に対しては 0.1 M の高濃度で共存する場合でも影響は表れなかった。高濃度(1.0×10^{-2} M 以上)の Cl^-および K^+が存在する場合には影響を受けるが(選択係数:$K_{Cl^-}=10^{-2}$、$K_{K^+}=10^{-3}$)、既存のセンサーに比べ大幅に改善できた。作成した NO_3^--ISE を用いて水耕栽培培養液中の NO_3^-濃度の長期間測定を行ったところ、植物の吸収による NO_3^-濃度の減少を確認できた。また、土壌中の硝酸イオン濃度についても、前処理等をせずに直接測定することができた。今後は、NO_3^-濃度を一定に制御するイオンスタットの構築や、複数イオン種を同時に測定できる系の開発にも取り組む予定である。

ion selective electrode, nitrate ion, on-site monitoring

発表責任者：中尾 英策（nakao.eisaku.72s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A12p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A12 会場

油脂資化性酵母 *Meyerozyma guilliermondii* TY-89 のアシルグリセロール資化特性
Assimilating of acylglycerol characteristics of lipid assimilating yeast, *Meyerozyma guilliermondii* TY-89

○小林 由衣乃[1]、日下部 征信[1]、竹園 恵[1]、中島 敏明[2]、茂野 俊也[3]、小野寺 正幸[1]([1]新潟工大工、[2]筑波大院生命環境、[3]つくば環微研)
○Yukino KOBAYASHI[1], Masanobu KUSAKABE[1], Satoshi TAKESONO[1], Toshiaki NAKAJIMA[2], Toshiya SHIGENO[3], Masayuki ONODERA[1] ([1]Niigata Inst. Tech., [2]Tsukuba Univ., [3]Labo. Tsukuba Microbial Env.)

【目的】動物性廃食用油の有効活用として、安価な窒素源(N 源)の添加により微生物菌体を培養し、家畜並びに養魚用飼料の生産を目指している。動物性食用油としてラードを炭素源(C 源)とした場合は植物油を C 源とした場合に比べて生育が不良であったことを昨年の本大会で報告した。[1)]我々は、その原因として食用油の脂肪酸組成の相違に起因しているものと考え、油脂資化性酵母(*Meyerozyma guilliermondii* TY-89 株,TY-89)の長鎖脂肪酸資化特性について検討したところ、ラウリン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、リノール酸は、資化速度が速く、一方、パルミチン酸とステアリン酸の資化速度が非常に遅いことを明らかにした。[2)]今回、さらにアシルグリセロール(AG)の資化特性について検討を行った。

【方法と結果】GPY 培地[1)]で、30℃24 時間回転振盪培養したものを前培養とした。本培養に用いる培地は、C 源として各種 AG 10g/L、N 源として硫酸アンモニウム 2g/L、その他無機塩からなる無機塩培地とした。バッフル付き 500ml 容三角フラスコ(培地量 100ml、シード接種量 4ml)で、30℃、120rpm の回転振盪培養を行った。菌体量は Whatman 製 glass microfiber filters, Grade GF/B を用いた乾燥菌体重量法及び EKDS 製トーマ血球計算盤による総細胞数の計測によって測定した。

培養 72 時間後の乾燥菌体重量法での結果として、ジオレイン酸グリセロールの場合は約 4.4g/L、pH1.9、トリオレイン酸グリセロールの場合は約 4.1g/L、pH2.0 と、生育は良好であった。一方、ジステアリン酸グリセロールの場合は菌体量が約 0.5g/L、pH5.8、トリステアリン酸グリセロールの場合は約 0.3g/L、pH6.0 と殆ど生育が認められなかった。しかし、予想に反して、モノステアリン酸グリセロールを C 源に用いた場合は菌体量が約 5.1g/L、pH2.3 と良好な生育が認められた。そこで、モノステアリン酸グリセロールの場合は、乾燥菌体重量法の結果に C 源の重量が含まれている可能性があると考え、総細胞数の測定を行い約 5.9×10^{9} 個/ml(培養開始時は、約 2.8×10^{8} 個/ml)と、良好な生育が確認された。以上のことから TY-89 は、モノステアリン酸グリセロールの資化も可能であることが明らかとなり、本菌によるトリグリセリドの加水分解産物として、二つの長鎖脂肪酸とモノアシルグリセロールの可能性が示唆された。今後、さらに検討を行う予定である。

1) 小林、日下部、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集、3J27a10.
2) 小林、日下部、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会関東支部 2017 年度支部大会講演要旨集、P-11.

acylglycerol, yeast, lipid assimilating

発表責任者：小野寺正幸（onodera@acb.niit.ac.jp）

講演番号：3A13a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A13 会場

新規 *in vitro* 運動モデルの確立及びβ-ヒドロキシ-β-メチル酪酸（HMB）の作用メカニズム解析への応用

establishment of a new *in vitro* exercise model and its application to analyze the mechanism of beta-hydroxy-beta-methylbutylate (HMB) on the contraction-induced protein synthesis

○佐藤 聡子[1]、高村 裕介[1]、山名 一綱[1]、野村 充[1]、内山 章[1]、古市 泰郎[2]、眞鍋 康子[2]、藤井 宣晴[2] ([1]ライオン株式会社 研究開発本部、[2]首都大学東京 人間健康科学研究科)

○Satoko SATO[1], Yusuke TAKAMURA[1], Ikko YAMANA[1], Mitsuru NOMURA[1], Akira UCHIYAMA[1], Yasuro FURUICHI[2], Yasuko MANABE[2], Nobuharu FUJII[2] ([1]Research and Development Headquarters, Lion Corporation, [2]Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University)

【背景と目的】レジスタンス運動（筋力トレーニング）による筋収縮は筋タンパク質合成を向上させるため，筋力増強及び筋力低下予防に効果的である．近年，運動による筋タンパク質合成をさらに促進する食品素材が複数報告されている．しかし，筋収縮による筋タンパク質合成能を簡便に評価できる培養細胞モデルはなく，これまで食品素材の評価はヒトや動物で実施されていた．本研究では，培養骨格筋細胞を用いて筋収縮によるタンパク質合成能をより簡便に評価できる新たな *in vitro* 運動モデルの構築を目指した．さらに，本モデルを食品素材によるタンパク質合成の評価に応用し，ロイシンの代謝物であり，ヒトにおいて運動との併用効果が報告されているβ-ヒドロキシ-β-メチル酪酸（HMB）を筋収縮と併用したときの筋力向上メカニズム解析を実施した．

【方法】1）*in vitro* 運動モデルの構築：ラット骨格筋由来の筋芽細胞（L6 細胞）を筋管細胞に分化させた後，電気刺激（100 Hz, 50 V, 10 分）を負荷した．電気刺激負荷 3 時間後に細胞を回収し，ウェスタンブロット法により骨格筋合成シグナルである mTORC1 経路及び Erk 経路の各因子のリン酸化レベルを評価した．

2）HMB の併用効果：1）と同様に細胞培養及び電気刺激負荷を行った．電気刺激負荷 2.5 時間後に HMB を添加して，添加 30 分後に細胞を回収し，ウェスタンブロット法により mTORC1 経路及び Erk 経路の各因子のリン酸化レベルを評価した．

【結果】1）電気刺激を負荷した細胞の Akt（Thr308），p70S6K（Thr389）及び Erk1/2（Thr202/Tyr204）のリン酸化レベルは，刺激を与えなかった細胞と比較して有意に高値を示した（$p<0.05$）．

2）電気刺激と HMB を併用した細胞の p70S6K 及び Erk1/2 のリン酸化レベルは電気刺激のみの細胞のそれと比較して有意に高値を示した（$p<0.05$）．

【結論と考察】L6 細胞に高周波数（100 Hz, 10 分）の電気刺激を負荷することで，レジスタンス運動負荷時に活性化されるタンパク質合成シグナルの mTORC1 経路及び Erk 経路が活性化した．低周波数（1 Hz, 60 分）の電気刺激では C2C12 細胞において p70S6K の活性化は報告されていないことから，今回用いた条件が，筋タンパク質合成能の評価に適したモデルであると考えられる．さらに，本モデルの活用により HMB は筋収縮による mTORC1 経路及び Erk 経路をより顕著に活性化させることで，筋タンパク質合成を促進することが示された．

muscle protein synthesis, contraction, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB)

講演番号：3A13a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A13 会場

β_2アドレナリン受容体の発現を促進する食品成分の探索とその成分による筋機能改善効果

Identification of food factors regulating β_2-adrenergic receptor expression and its effect for skeletal muscle function.

○近澤 未歩、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Miho CHIKAZAWA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【背景】

骨格筋の筋量や筋力の維持は、高齢者の筋萎縮（サルコペニア）の増加が見られる現代では特に重要である。G タンパク質共役受容体（GPCR）は 7 回膜貫通構造を持つ受容体ファミリーである。骨格筋における GPCR シグナルの活性化は、筋増強や筋萎縮抑制に有用であることがこれまでに多数報告されており、サルコペニア予防における有用性が期待される。

【目的】

骨格筋における筋機能改善に寄与することが知られる GPCR であるβ_2アドレナリン受容体（β_2-AR）に着目した。骨格筋におけるβ_2-AR の発現増加が筋重量増加を引き起こすことが予想されることから、β_2-AR の発現を亢進するような食品成分を見出し、筋機能の改善やサルコペニア予防における有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】

マウスβ_2-AR 上流（-1500/+1）のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドを作製し、350 種類の食品成分ライブラリよりプロモーター活性化能を持つ食品成分の探索を行った。その結果、スチルベノイドポリフェノールである Resveratrol（RSV）、イソフラボンである Genistein（GEN）がβ_2-AR プロモーターを活性化させること、C2C12 細胞においてβ_2-AR の mRNA レベルを亢進することが明らかになった。

食品成分による発現制御機構を明らかにするため、様々な長さのβ_2-AR プロモータープラスミドを作製してレポーターアッセイを行い、重要な配列の絞り込みを行った。その結果、プロモーター上に存在する GC-box（-383/-373）と CCAAT-box（-294/-290）が重要であることが予想された。2 箇所の配列それぞれに変異を導入したプロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、食品成分によるプロモーター活性の上昇が抑制された。また、生体における食品成分の筋機能改善効果を証明するため、マウスに GEN 含有食の摂食とβ_2-AR アゴニストであるクレンブテロールの投与を同時に行ったところ、GEN により骨格筋のβ_2-AR 発現が増加すること、クレンブテロールによる筋重量増加がさらに亢進することが確認された。現在、発現制御に関与する転写因子の同定、食品成分を介したβ_2-AR 発現制御機構の解明を進めている。

GPCR, Resveratrol, Genistein

講演番号：3A13a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A13 会場

マスリン酸による筋肥大効果の解析

Effect of maslinic acid on skeletal muscle hypertrophy

○村田 翔太朗、佐々木 崇、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Shotaro MURATA, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【目的】

超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮に伴う運動機能の低下（ロコモティブシンドローム）は要介護のリスクファクターとなり、健康寿命の短縮、医療費の増大の原因となっている。そのため健全な食生活による運動機能の維持が望まれ、食品成分による骨格筋への影響とその分子メカニズムの解明はロコモティブシンドロームを解決する上で重要であるといえる。本研究では、ロコモティブシンドローム予防に有望な成分としてオリーブに含まれるトリテルペン、マスリン酸に着目した。マスリン酸は摂取することで高齢者の筋量増加に寄与することが報告されているが、その詳しい分子メカニズムは明らかになっていない。筋肥大に関わる分子メカニズムとしては、mTORC1 経路が一般的に知られているほか、当研究室の先行研究によって胆汁酸受容体 TGR5 の筋肥大への寄与が明らかになっており、一部のトリテルペンには TGR5 や mTORC1 を活性化するものが知られている。そこで TGR5 および mTORC1 に着目し、マスリン酸の筋肥大効果の検証およびそのメカニズムの解明を目指した。

【方法】

マスリン酸を 0.27%含む餌を C57BL/6 マウスに 4 週間与え、筋重量などを測定した。また、TGR5 へのアゴニスト活性をレポーターアッセイにより評価した。さらに、培養骨格筋細胞 C2C12 に対するマスリン酸の投与実験を行った。RT-qPCR 法による筋肥大関連遺伝子の発現測定、puromycin を用いた SUnSET 法によるタンパク質生合成量の評価、ウエスタンブロットによる各種タンパク質の発現やリン酸化の測定を行った。

【結果と考察】

マスリン酸を摂食したマウスにおいて筋重量の増加が確認された。TGR5 に関する効果としては、マスリン酸投与による TGR5 の活性化と、TGR5 を介した筋肥大関連遺伝子の発現増加が確認された。また、C2C12 においてマスリン酸投与によるタンパク質生合成の亢進が見られ、mTORC1 の阻害によりその効果が抑制された。これらの結果からマスリン酸は筋肥大効果を示し、その効果には TGR5 や mTORC1 の活性化が関与していると考えられる。

skeletal muscle, triterpenoid, tgr5

講演番号：3A13a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A13 会場

脳梗塞重症化予防効果を持つ食品成分探索のためのヒトバイオマーカーの開発
Development of human biomarkers for finding food components which prevents severe cerebral infarction

○田熊 彩子[1]、斎藤 芳和[1]、阿部 新[2]、上田 雅之[3]、仁藤 智香子[2]、木村 和美[2]、阿部 啓子[1,4]、朝倉 富子[1] ([1]東大院・農生科、[2]日医大、[3]多摩総合医療センター、[4]KISTEC)
○Ayako TAKUMA[1], Yoshikazu SAITO[1], Arata ABE[2], Masayuki UEDA[3], Chikako NITO[2], Kazumi KIMURA[2], Keiko ABE[1,4], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Nippon Medical School, [3]Tokyo Metropolitan Tama Medical Center, [4]KISTEC)

［背景・目的］
日常的に摂取することで脳梗塞発症時の悪化を防ぎ、後遺症の軽減をもたらす食品成分の探索が現在主にモデル動物を用いて行われている。その成分の効果を評価する際、成分を投与した動物に人為的に脳梗塞を発症させた後、脳切片を染色して脳細胞の死滅度合いを指標にする侵襲的な方法が用いられてきた。しかし本方法では脳梗塞後の継時的な変化を観察することが不可能である。そこで、脳梗塞の状態を反映する血中成分が見つかれば、脳梗塞後の状態の継時的な変化を非侵襲的に観察でき、食品成分の効果をより詳細に検証することが出来ると考えた。特に microRNA は血中に安定して存在する分子で、バイオマーカーとしての利用が期待されている。我々は既に、ラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて全血中の miRNA を解析し、脳梗塞発症時に有意に発現変動するバイオマーカー候補の miRNA を抽出し報告した*。そこで本研究では、ヒトにおいて脳梗塞によって生じる全血中の miRNA の発現変動を観察し、特にヒトにおいても活用可能な新規血中バイオマーカーとしての miRNA を探索することを目的とした。このバイオマーカーによって、食品成分の効果をヒト試験においても検証することが可能になると期待される。
［方法・結果］
日本医科大学武蔵小杉病院にて脳梗塞の患者と脳梗塞でない患者から採血を行い、それぞれ脳梗塞群と非脳梗塞群のサンプルとした。全血から total RNA を抽出し、miRNA のマイクロアレイ解析を行った。脳梗塞発症後の経過日数・重症度・脳梗塞の種類等で脳梗塞群を細分化し、性別・年齢が揃う非脳梗塞群と比較を行った。データ解析を行い、2 群間比較により p-value < 0.05 かつ |Fold Change| ≧ 1.5 を満たす miRNA を有意に発現変動したとして抽出した。抽出された miRNA に関して、報告済みのラットのバイオマーカー候補 miRNA との対応を試みた。これらの解析の結果、脳梗塞特異的と思われる miRNA がいくつか抽出された。これらの miRNA に関して RT-qPCR で発現量を解析し、ヒトにおける脳梗塞のバイオマーカーとしての有用性を検証した。
［謝辞］
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。
*Takuma, A., et al. (2017). *Int. J. Mol. Sci.*, *18*(11), 2335.

stroke, biomarker, microRNA

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A13a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A13 会場

In vitro 潰瘍性大腸炎患者大腸フローラモデルの構築

In vitro human colonic microbiota model of ulcerative colitis

○佐々木 建吾[1]、井上 潤[2]、星 奈美子[2]、佐々木 大介[1]、近藤 昭彦[1]、大澤 朗[3] ([1]神戸大・科学技術イノベ、[2]神戸大・医、[3]神戸大・農)
○Kengo SASAKI[1], Jun INOUE[2], Namiko HOSHI[2], Daisuke SASAKI[1], Akihiko KONDO[1], Ro OSAWA[3] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ.)

【背景と目的】潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に炎症が起こる疾患であり、罹患者数は増加しているものの根本的治療法は確立されていない。潰瘍性大腸炎の原因の一つとして腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis と呼ばれている）が挙げられており、患者の腸内細菌叢を健常な状態に戻すことが求められている。一方、我々は健常人のヒト腸内細菌叢バランスを培養器の中に再現し、機能性食品成分の投与により細菌叢の変動や代謝プロファイルをモニターできる「ヒト大腸フローラモデル」について報告しており[1)]、動物給餌試験やヒト介入試験による *in vivo* 系に先立つ試験系として有用であると考えられる。疾患患者の治療戦略を立てるためにも *in vitro* モデルの構築が求められており、そこで本研究においては本 *in vitro* 系内に潰瘍性大腸炎患者大腸フローラモデルを構築することを目的とした。
【方法と結果】培養器に GAM 培地を基礎培地として投入して、嫌気状態を保つために窒素・二酸化炭素混合ガスを曝気した。初期 pH を 6.5 に調整して、潰瘍性大腸炎患者ないしは健常人（コントロール）の糞便を投入して 37℃で 30 時間培養した。定期的に培養液を採取して、高速液体クロマトグラフィーにより短鎖脂肪酸の測定を行った。また DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子を対象として次世代シーケンサーにて菌叢解析を行った。その結果、潰瘍性大腸炎患者のモデルにおいては健常人のモデルと比較して、異なる細菌叢が形成されており糞便中での観察結果と一致した。さらに患者のモデルにおいては有意に酪酸生産濃度が減少しており、潰瘍性大腸炎患者大腸フローラモデルが構築されていると考えられた。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。

1)2015 年度日本農芸化学会大会

ulcerative colitis, gut, in vitro model

発表責任者：佐々木建吾（sikengo@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A13a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A13 会場

微細藻類ユーグレナの経口摂取が排便および腸内細菌叢に及ぼす影響

Modulation of gut microbiota and defecation by *Euglena gracilis* ingestion

○中島 綾香、安田 光佑、鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ)
○Ayaka NAKASHIMA, Kosuke YASUDA, Kengo SUZUKI (euglena Co., Ltd.)

【背景】
ヒトの腸内には、100 種類以上の腸内細菌が 100 兆個以上生息しており、腸内細菌の集団は腸内細菌叢と呼ばれている。腸内細菌は、腸内で相互にバランスを保ちながら腸内細菌叢を形成しており、その菌叢のバランスが、ヒトの健康と関連していることが近年明らかになってきた。疾病、老化、精神的・肉体的ストレス、環境の変化、食生活の変化などの原因により腸内細菌叢のバランスが崩れると、特定の菌が増加することで有害物質が腸内で増加し、便秘や下痢、免疫機能の低下が生じる。
ユーグレナは、微細藻類に分類される単細胞の微生物である。植物と動物両方の性質を兼ね備えていることから、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸等多様な栄養素を含んでおり、栄養補助食品やサプリメントとして活用されている。また、ユーグレナの貯蔵多糖、パラミロンは、生活習慣病や免疫機能亢進などさまざまな効果があるとされている β-1,3-グルカンの一種である。
【目的・方法】
本試験においては、ユーグレナの継続摂取による排便と腸内細菌叢を 28 名の男女にて検証した。具体的には、28 名の男女が 1 日朝晩 1 g ずつ、合計 2 g のユーグレナ含有カプセルを 4 週間摂取した前後でのブリストルスケールによる排便状況の比較、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の比較を行った。
【結果・考察】
ユーグレナの摂取によって、1 回の排便量が摂取 4 週間で有意に増加した。排便頻度は増加傾向を示した。それにより、1 日の排便量も摂取 4 週間で有意に増加した。この傾向は特に便秘傾向の被験者において、強く現れた。一方、便のにおい、便の色、便の性状に、ついては大きく変化はなかった。
腸内細菌叢の解析を行った結果、Faecalibacterium 属、Parabacteroides 属、Streptococcus 属、Turicibacter 属などにて、摂取前後で占有率が増加する傾向がみられた。さらに、1 日の排便量において増加傾向があった被験者と増加傾向のなかった被験者では、それぞれ変動した菌が異なっている傾向も一部観察された。
以上のことから、ユーグレナを摂取することで、排便の促進、腸内細菌叢の変動を起こし、ユーグレナがプレバイオティクス等の機能性食品として機能する可能性が示唆された。

Euglena, defecation, gut microbiota

講演番号：3A13a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A13 会場

睡眠の質改善素材“清酒酵母”による日中の疲労改善と活力向上機能

Sleep care supplement including Japanese sake yeast improves daytime fatigue and vitality: a double-blind randomized controlled clinical trial

○永盛 友樹[1]、平尾 香織[1]、物井 則幸[1]、内山 章[1]、裏出 良博[2]([1]ライオン(株)、[2]筑波大 WPI-IIIS)
○Yuki Nagamori[1], Kaori Hirao[1], Noriyuki Monoi[1], Akira Uchiyama[1], Yoshihiro Urade[2] ([1]Lion Corporation, [2]WPI-IIIS, University of Tsukuba)

【背景および目的】

我々は、清酒酵母に睡眠の質向上機能（深睡眠の指標であるデルタ波パワー値の増加、睡眠時の成長ホルモン分泌量増加、起床時の眠気の低下）を確認している(Monoi *et al*, J Sleep Res. 2016)。睡眠は生体維持の基本的現象である為、睡眠の質向上には 2 次的な健康改善機能が期待される。特に、清酒酵母の特徴的な機能である深睡眠の増加は、日中の疲労感と相関することが報告されていることから、本研究では、清酒酵母を摂取することで、日中の疲労感が軽減し、活力が向上するかを検討した。

【方法】

睡眠不満のある健康な成人（ピッツバーグ睡眠質問票が 5 点以上）36 名を被験者とし、被験食品（清酒酵母 GSP6 300mg/日）と対照食品を用いて、二重盲検クロスオーバー試験を実施した。被験者の構成は、男性 18 名、女性 18 名、平均年齢±標準誤差：34.9±1.4 歳であった。順序効果を考慮し、被験食品を先に摂取する群と、対照食品を先に摂取する 2 群に被験者を分けた。被験者は月～木曜日の就寝 1 時間前に試験食品を摂取し、摂取翌日の火～金曜日に各種評価を行った。主要評価項目として、16 時に VAS 法により日中の疲労感の蓄積を評価した。また、各週の金曜日に SF8 Health Survey (SF8) を実施し、1 週間の活力の評価を行った。副次評価項目として、OSA 睡眠調査表を用いて、睡眠の質の評価を行った。

【結果】

対照食品と比較して、清酒酵母摂取時に日中の疲労感が有意に軽減し（$p < 0.01$）、活力が有意に上昇した（$p = 0.02$）。また、睡眠の質の評価では、起床時の眠気（$p = 0.03$）および疲労回復（$p = 0.04$）が清酒酵母摂取時に有意に改善した。これらの評価項目間の相関解析を実施した結果、疲労感または活力の改善度が、睡眠の質（起床時の眠気、疲労回復）の改善度と有意に相関していた。

【結論】

睡眠の質改善機能を持つ清酒酵母の摂取は、日中の疲労感の蓄積を抑制し、活力を向上させることが明らかとなった。更に、相関解析の結果から、清酒酵母が睡眠の質を介して、疲労感や活力の改善に機能していることが示唆された。

sleep, fatigue, sake yeast

講演番号：3A13a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A13 会場

酸化食用油による神経細胞死誘導機構

Mechanism of action of neuronal cell death by oxidized edible oil

○上野 有紀[1]、川本 善之[2]、中根 大和[1]、夏目 梨冴[1]、三浦 叶子[1]、大澤 俊彦[1] ([1]愛知学院大心身科学、[2]中部大生命健康)
○Yuki UENO[1], Yoshiyuki KAWAMOTO[2], Yamato NAKANE[1], Risa NATSUME[1], Kyoko MIURA[1], Toshihiko OSAWA[1] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Chubu Univ.)

【目的】

近年、植物性食用油に含まれるα－リノレン酸の生理機能が注目され、高含有の食用油の需要が高まっている。しかしながら、α－リノレン酸は非常に酸化されやすいことから、酸化油の多量摂取による生体影響には注意が必要である。我々は 2016 年の本大会において、酸化食用油のヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y への影響について、酸化されたシソ油・アマニ油が細胞生存率を低下させることを報告した。しかしながらその作用機構が明らかではないことから、本研究では酸化油による神経細胞死誘導機構を検討した。

【方法】

市販の各種食用油（サラダ油、なたね油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、大豆油、シソ油、アマニ油、グレープシード油）を 60℃、3 日間インキュベートし、細胞実験に用いた。ヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y を各種の酸化食用油含有培地で 24 時間培養した。アポトーシス細胞を検出するために、細胞をエタノールで固定させ、RNase 処理後 PI 染色し、FACS 解析により細胞の SubG1 ピークを比較した。また細胞内の ROS を検出するために、10μM CM-H_2DCFDA を細胞に取り込ませた後、FACS 解析を行った。

【結果・考察】

各種食用油のうち、酸化されたシソ油およびアマニ油は、神経細胞におけるアポトーシスを誘導したが、他の酸化食用油ではその影響はなかった。また細胞内の ROS 生成を検討したところ、酸化シソ油およびアマニ油により ROS 生成が有意に増加したが、他の酸化食用油では有意差は認められなかった。これらの結果から、酸化シソ油およびアマニ油は神経細胞内での過剰な ROS 生成を介して、アポトーシスを誘導する可能性が示唆された。さらに酸化シソ油およびアマニ油によるアポトーシス関連因子（Caspase, Bax, Bcl-2 等）への影響を検討している。

oxidation, edible oil, cell death

発表責任者：上野　有紀（ueno@dpc.aichi-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A13a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A13 会場

酒粕の腸クロム親和性細胞に対するセロトニン産生促進効果

The stimulatory effect of sake lees on serotonin releasing from enterochromaffin cell

○柴田 裕介、山田 翼、田中 伸哉（菊正宗・総研）
○Yusuke SHIBATA, Tasuku YAMADA, Nobuchika TANAKA (Kiku-masamune)

【緒言】酒粕はコレステロール上昇抑制効果などの様々な機能性を有しており、栄養学的に見ても非常に優れた発酵食品素材である。しかし、酒粕の風味を苦手としている人々が多く、一部の人々にしか食されていない。そこで、酒粕を乳酸菌で醗酵させ、酸味を付与することで、酒粕を食しやすい形にした酒粕乳酸菌飲料の開発を試みた。さらに、ストレス社会とも言われる日本の社会の現状を踏まえ、この飲料に心を穏やかにするような健康効果も付与したいと考え、Nakaita らの報告[1]を参考に、自社で保有している生酛由来乳酸菌株から、腸クロム親和性細胞のセロトニン産生を促進する乳酸菌株を選抜し、それを用いて酒粕を醗酵することとした。この開発過程において、酒粕に腸クロム親和性細胞のセロトニン産生を促進する効果があるという新たな知見が得られたため、報告する。
【方法、結果及び考察】生酛由来の乳酸菌 16 株から Nakaita らの方法[1]により腸クロム親和性細胞のセロトニン産生を最も促進した乳酸菌株、*L. sakei* LK134 株を選抜した。その後、乾燥酒粕粉末、白砂糖をそれぞれ 5%、2%となるよう 70℃の湯に懸濁し、70℃で 3 時間糖化処理することで作製した酒粕培地に LK134 株を植菌し、10℃で約 10 日間醗酵させることにより、酒粕乳酸菌飲料を試作した。この飲料にもセロトニン産生促進効果があるか確認するため、HBSS 緩衝液に酒粕乳酸菌飲料を 5%となるよう添加した溶液を細胞に作用させ、セロトニンの放出量を測定したところ、HBSS 緩衝液のみを細胞に作用させたコントロールよりも有意に高かったことから、酒粕乳酸菌飲料にもセロトニン産生促進効果が認められた。しかし、酒粕培地に醸造用乳酸を添加することで作製した酒粕飲料(乳酸菌体を含まない)を同様の実験に供したところ、この酒粕飲料にも酒粕乳酸菌飲料と同等のセロトニン産生促進効果が認められた。また、酒粕飲料の原料を酒粕から米粉に代えて作製した米粉飲料にはセロトニン産生促進効果が認められなかった。これらのことから、LK134 株だけでなく、酒粕に腸クロム親和性細胞のセロトニン産生を促進する効果があると考えられた。腸クロム親和性細胞は微生物認識に関わる Toll 様受容体を持つこと[2]、短鎖脂肪酸は腸クロム親和性細胞を刺激し、セロトニンを放出させること[3]が報告されている。酒粕には麹菌や酵母の菌体成分、これらの菌の代謝産物などが含まれており、これらの物質がセロトニン産生促進効果に関与している可能性が考えられる。
【参考文献】1) Nakaita, Y. et al., Food Nutr. Sci., 4, 767-771, 2013
2) Bogunovic, S. H. et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 292, G1770-G1783, 2007
3) Fukumoto, S. et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R1269-R1276, 2003

sake lees, serotonin, enterochromaffin cell

発表責任者：柴田裕介（y-shibata@kikumasamune.co.jp）

講演番号：3A13a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A13 会場

種々の日本産ショウガ(Zingiber offinale)のプロテアーゼ活性の評価に関する研究

Assessments of proteolytic activity of ginger (Zingiber officinale Roscoe) obtained from Japanese Market

○山田 徳広[1]、津村 和伸[2]、苔庵 泰志[3]、梅谷 かおり[3]、清水 純[4]、栗田 修[3] ([1]津市立三重短大、[2]不二製油グループ本社（株）、[3]三重県工業研、[4]城西大)
○Norihiro Yamada[1], Kazunobu Tsumura[2], Kokean Kokean[3], Kaori Umetani[3], Jun Shimizu[4], Osamu Kurita[3] ([1]Tsu City Coll., [2]Fuji Oil Holdings Inc., [3]Mie Prefecture Industrial Research Inst., [4]Josai Univ.)

【目的】ショウガ（ingiber offinale）にはシステインプロテアーゼ（ジンジバイン, EC 3.4.22.67）（GP）が含まれている事が知られ、その分子量，アミノ酸組成，立体構造などが研究されている。日本では、ショウガは主に 2 つの方法で分類されている。ひとつは、消費されるときの大きさによる大ショウガ，中ショウガ，小ショウガという分類であり、もうひとつは、収穫後の熟成期間の違いによる新ショウガとひねショウガという分類である。また、日本では 15 種類のショウガが品種登録されている。これまでにショウガの大きさ，熟成状態，栽培品種の違いによるプロテアーゼ活性の違いに関する知見はほとんど見当たらない。そこで、中国の品種 2 種，新ショウガ 2 種を含む 12 種類のショウガのプロテアーゼの状態を比較検討した。
【方法】中国の品種 2 種，新ショウガ 2 種を含む 12 種類のショウガを用い、カゼイン分解活性，SDS-Page，高次構造を維持しながらタンパク質を分離できる Blue Native-Page，ザイモグラフィーによってそれらのプロテアーゼの状態を比較検討した。
【結果】日本品種のショウガでは，柳黄金が高いプロテアーゼ活性を示した一方で、黄金虚空蔵Ⅱと土佐太一は低いプロテアーゼ活性を示した。使用した 2 種の中国品種は、共に高いプロテアーゼ活性を示した。新ショウガ 2 種は、共にほとんどプロテアーゼ活性を示さなかった。同じ栽培品種であっても、大きさや熟成状態によってプロテアーゼ活性が異なっていた。SDS-Page と Blue Native-Page の結果から、GP は約 30kDa の単量体で存在するものと考えられた。カゼインとゼラチンザイモグラフィーの結果から、GP の状態は、ショウガの大きさ，熟成度，栽培品種によって大きく異なった。
【考察】同じ栽培品種、大きさ、熟成状態であっても、GP の活性は大きく異なっていた。GP の状態は、栽培品種だけではなく、栽培条件や保存条件によっても大きく変化するものと考えられた。

Ginger, Protease, Electrophoretic

発表責任者：山田徳広（nyamada@tsu-cc.ac.jp）

講演番号：3A13a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A13 会場

果実・野菜エキスの生産効率を高める技術の開発　１）タマネギ
Development of the efficiency technique to make production of fruit or vegetables extract 1) Onion
○三輪 章志[1]、吉田 郁子[1]、田中 伸一郎[2] ([1]石川県農総研、[2]三菱ケミカルフーズ)
○ Shouji Miwa[1], Ikuko Yoshida[1], Shinichirou Tanaka[2] ([1]Ishikawa Agr. For. Res. Cent., [2]Mitsubishi-Chemical Foods Corp.)

【目的】近年、食品業界では、消費者の健康志向の高まりから果実や野菜に含まれる機能性成分を用いた商品の開発が注目されている。そのため、その原料となる機能性成分を含んだ果実や野菜のエキスの需要が高まっている。果実や野菜のエキス化の簡便な方法としては、原料のペーストに加水後に煮沸することで、ペーストを液化することが考えられる。しかし、本技術では、高い温度で長時間加熱することから、目的の機能性成分が変質または、分解する恐れが有る。そこで、より低い温度で効率よく果実や野菜の組織を分解できる酵素反応によるエキス化の技術がより実用的と考えられ、業界でも注目されている。本研究では、エキス化の需要も高く機能性成分を有する野菜としてタマネギを対象に効率よくエキス化するための酵素剤の複合利用条件を検討したので報告する。
【方法】供試材料は、石川県農林総合研究センターで栽培したタマネギ（品種名：七宝甘 70）を用いた。酵素剤は、ペクチナーゼ（スクラーゼN）、セルラーゼ（スクラーゼC）、ヘミセルラーゼ（スクラーゼX）、澱粉分解酵素（コクラーゼ）いずれも三菱ケミカルフーズ社製を用いた。酵素反応は、ペースト状のタマネギ 100g と蒸留水 100ml の割合で混合した試料液に各種組み合わせの酵素剤を各 25mg づつ添加して 30～60℃の範囲の反応温度で 17 時間振とう反応させた後に、90℃30 分の失活処理を行った。試料の液化程度は、反応液を吸引ろ過して得られた残渣量を測定した。機能性成分含量は、ポリフェノール、ケルセチン、粗繊維について測定を行った。
【結果】反応温度を 40℃一定で酵素単品ごとの液化能を残渣量で比較したところ、ペクチナーゼが最も高い効果を示した。また、ペクチナーゼとセルラーゼやヘミセルラーゼを組み合わせることによりペクチナーゼ単独よりもさらに液化能が向上した。また、機能性成分の抽出については、ろ液中の粗繊維分解物は、3 つの酵素を組み合わせた処理条件で残渣量を減らした方が増加する傾向であった。一方、ポリフェノールやケルセチン含量は、ペクチナーゼ単独での処理条件でも酵素を組み合わせた処理条件と同程度の含量であった。さらに、反応温度と添加酵素の組み合わせを変えて液化能と機能性成分の抽出効率を比較した。液化能およびポリフェノールやケルセチンの抽出効率は、40℃が最も効率が良かった。ただし、粗繊維については、反応温度による含量差は確認できなかった。
　以上から、タマネギのエキス製造時の液化能と機能性成分抽出能ともに高めるためには、ペクチナーゼ、セルラーゼおよびヘミセルラーゼを組み合わせて 40℃で反応させることが適していた。

enzyme, onion, extract

発表責任者：三輪章志（s-miwa@pref.ishikawa.lg.jp）

講演番号：3A13a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A13 会場

果実・野菜エキスの生産効率を高める技術の開発　2）リンゴ
Development of the efficiency technique to make production of fruit or vegetables extract 2) Apple
○吉田 郁子[1]、三輪 章志[1]、田中 伸一郎[2] ([1]石川県農総研、[2]三菱ケミカルフーズ)
○ Ikuko YOSHIDA[1], Shouji MIWA[1], Shinichirou TANAKA[2] ([1]Ishikawa.Agr.For.Res.Cent., [2]Mitsubishi-Chemical Foods Corp.)

【目的】近年、食品業界では、消費者の健康志向の高まりから果実や野菜に含まれる機能性成分を用いた商品の開発が注目されている。そのため、その原料となる機能性成分を含んだ果実や野菜のエキスの需要が高まっている。果実や野菜のエキス化の簡便な方法としては、原料のペーストに加水後煮沸することで、ペーストを液化することが考えられる。しかし、本技術では、高い温度で長時間加熱することから、目的の機能性成分が変質、または分解する恐れがある。そこで、より低い温度で効率よく果実や野菜の組織を分解できる酵素反応によるエキス化の技術がより実用的と考えられ、業界でも注目されている。本研究では、エキス化の需要も高く機能性成分を有する果実としてリンゴを対象に、効率よくエキス化するための酵素剤の複合利用条件を検討したので報告する。
【方法】供試材料は、石川県農林総合研究センターで栽培したリンゴ（品種名：秋星）を用いた。酵素剤は、ペクチナーゼ（スクラーゼN）、セルラーゼ（スクラーゼC）、ヘミセルラーゼ（スクラーゼX）、澱粉分解酵素（コクラーゼ）いずれも三菱ケミカルフーズ社製を用いた。酵素反応は、みじん切りにしたリンゴ 100g と蒸留水 100ml の割合で混合した試料液に各種組み合わせの酵素剤を各 25mg ずつ添加して 30～60℃の範囲の反応温度で 17 時間振とう反応させた後に、90℃30 分の失活処理を行った。試料の液化程度は、反応液を吸引ろ過して得られた残渣量を測定した。機能性成分については、ポリフェノール、粗繊維の含量と抗酸化能を測定した。
【結果】反応温度を 40℃一定で酵素単品ごとの液化能を残渣量で比較したところ、ペクチナーゼが最も高い効果を示した。また、ペクチナーゼとセルラーゼやヘミセルラーゼを組み合わせることによりペクチナーゼ単独よりもさらに液化能が向上した。また、機能性成分の抽出については、ろ液中の粗繊維分解物は、3 つの酵素を組み合わせた処理条件で残渣量を減らした方が増加する傾向であった。一方、ポリフェノール含量や抗酸化能は、ペクチナーゼ単独での処理条件でも酵素を組み合わせた処理条件と同程度の含量であった。さらに、反応温度と添加酵素の組み合わせを変えて液化能と機能性成分の抽出能を比較した。液化能については、40℃程度で最も効率が良かったが、ポリフェノール量およびその効果である抗酸化能については 60℃で最も高かった。また、ペクチナーゼ単品試験区のみで検討した粗繊維含量は、40℃以上の反応で増加した。このことから、酵素の反応温度については、組織液化と成分抽出において最適な温度条件が異なるため、用途に応じ酵素の組み合わせや反応温度を変える必要がある。

Enzyme, Apple, Extract

発表責任者：吉田　郁子（ikuko-i@pref.ishikawa.lg.jp）

講演番号：3A13a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A13 会場

糖類添加培養によるナットウキナーゼの生産

Study on Productivity of nattokinase by the Saccharide addition culture

○太田 さくら[1]、柳澤 泰任[1]、内藤 佐和[2]、足立 達美[1]、須見 洋行[2]([1]千葉科学大薬、[2]倉敷芸術科学大生命科学)
○ Sakura Ota[1], Yasuhide Yanagisawa[1], Sawa Naito[2], Tastumi Adachi[1], Hiroyuki Sumi[2] ([1]Department of Pharmacy,Chiba Institute of Science, [2]Department of Life Science,Kurashikigeijyutukagaku University of Science and the Arts)

【目的と背景】
日本の伝統食品である納豆には、血栓溶解酵素であるナットウキナーゼ（ＮＫ）や骨形成に必須なビタミンＫ２（メナキノン－７：ＭＫ－７）などの生理活性物質が多く含まれる。ＮＫは血栓に直接作用するほか血栓症治療薬に使用されるウロキナーゼの前駆体であるプロウロキナーゼを活性化する作用が認められているため（日本食品科学工学会誌、４３：１１２４‐１１２７，１９９６）、サプリメントだけではなく治療薬や予防薬への応用が期待されている。これまでの研究でグリセロール添加による生理活性物質の生産性向上を確認しているが、今回糖類添加培地による液体培養を行い、ＮＫの生産性について比較検討を行った。
【方法】
納豆菌は宮城野菌を前培養（４１℃、１，２００ｒｐｍ、２０時間）した２０μＬをシードとして使用し、２％ハイポリペプトンＳを基本培地として５％になるように各種糖類（グルコース、スクロース、グリセロール、トレハロース）を添加して培養を試験管で行った（４１℃、３日、１，２００ｒｐｍ）。ＮＫ活性の測定は、培養後の上清（遠心分離：４℃、１０分、１２，０００rpm）をフィブリン平板法（Ｅｘｐｅｒｉｅｎｔｉａ，４３:１１１０，１９８４）にしたがい、３７℃、１８時間後に生じる溶解面積窓（ｍｍ^2）を計測した。
【結果および考察】
各種糖類を５％添加で培養した今回の結果では、ＮＫ活性はインキュベーション１８時間後においてスクロースおよびトレハロースの活性が高く、最も低かったグリセロール添加に対し、７～８倍高いことが確認された。今後は、添加濃度の違いによるＮＫ生産性について検討したい。

Bacillus subtilis natto, Nattokinase, Saccharide

発表責任者：柳澤泰任（yynagisawa@cis.ac.jp）

講演番号：3A13a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A13 会場

D 体アミノ酸添加によるナットウキナーゼ増産

Nattokinase increase by addition of D-amino acid

○柳澤 泰任[1]、大杉 忠則[2]、矢田貝 智恵子[2]、須見 洋行[2]([1]千葉科学大学薬学部、[2]倉敷芸術科学大学生命科学部)
○Yasuhide Yanagisawa[1], Tadanori Ohsugi[2], Chieko Yatagai Chieko[2], Hiroyuki Sumi[2] ([1]Faculty of Pharmaceutical Sciences,Chiba Institute of Science, [2]Department of Life Science, Kurashiki University of Science and the Arts)

【目的】
我々は、これまで血栓溶解酵素ナットウキナーゼ（NK）ならびに水溶性ビタミン K2（メナキノン-7 ：MK-7）の生産性の向上、また水溶性 MK-7 の経口投与による効果（農化:73、599、1999)、また、NK の精製および X 線結晶解析により 3 次構造を明らかにしてきた（*J. Synchrotron Rad.*, **20**, 875-879, 2013)。NK 生産性向上については、納豆菌の種類、培養条件などについて検討を継続して検討しており、今回、各種アミノ酸添加による振盪培養を行い、NK 生産性の比較検討を行った。
【方法】
2%ハイポリペプトン S-3%グリセロール培地を基本として、アミノ酸（L 体、D 体）をそれぞれ 1 %になるように培地へ添加した。HCl および NaOH を用いて pH7.0 に調整した培地をオートクレーブ（120℃、20 分）で滅菌後、37℃、24 時間または 42℃、20 時間で前培養し、凍結保存したシード培地を 20μL 添加後、41℃、1,200rpm で 7 日間振盪培養を行った。NK 活性の測定は、菌体懸濁液を遠心分離(12,000rpm、10min、4℃)後の上清 30μL をサンプルとし、フィブリン平板法（*Experientia*, **43**:1110, 1984）に準じ、インキュベーション（37℃、18 時間）後の溶解面積窓（㎟）を計測した。
【結果および考察】
アミノ酸添加培養により、NK の生産性が向上することが認められた。アミノ酸非添加培養に比べ、最も NK 活性が高かったアミノ酸は D 体アミノ酸のフェニルアラニンであり、その比率は約 8 倍であった。一方、L 体アミノ酸添加で最も NK 活性が高かったのは、ロイシンの約 2 倍であり、総体的に D 体アミノ酸の方が生産性を高める効果があることが明らかになった。今後、アミノ酸添加濃度や納豆菌数など、詳細な培養条件の検討を行い、さらなる NK の生産性向上につなげたい。

Bacillus subtilis natto, nattokinase, amino acids

発表責任者：柳澤　泰任（yyanagisawa@cis.ac.jp）

講演番号：3A13a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A13 会場

赤茎ホウレンソウの特徴の解析と機能性向上を目指した水耕栽培系の確立

Preparation of biofunctional red-tube spinach by strategic hydroponics

○渡辺 祥[1]、青木 航[1,3]、宇野 祐子[2]、助清 泰教[2]、窪川 清一[2]、植田 充美[1,3]([1]京大院・農・応用生命、[2]三菱ケミカル、[3]KISTIC-BIC)
○Sho WATANABE[1], Wataru AOKI[1,3], Yuko UNO[2], Yasunori SUKEKIYO[2], Seiichi KUBOKAWA[2], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Mitsubishi Chemical, [3]KIST-BIC)

【背景】ポリフェノールやテルペノイドといったファイトケミカルは、植物中に存在する天然の化合物であり、生体調節機能と深く関わっているとして注目されている。赤茎ホウレンソウは葉柄・葉脈が赤い品種であり、その色素成分はまだ完全には判明していない。これまで農作物を対象にした機能性化合物を増強する試みは、主に遺伝子操作によるものである。しかしながら、遺伝子組み換え作物の市場への流通は法的規制により難しい。我々はこれまでに、遺伝子組み換えを用いることなく、水耕栽培による液肥の成分調整によってホウレンソウの機能性化合物を付加できることを示してきた[1]。本研究では、赤茎ホウレンソウを対象に、赤色色素成分の同定と栽培条件の改良によってその色素成分の含有量が増加したホウレンソウの作製に取り組んだ。

【方法】これまでにホウレンソウの水耕栽培系は確立されている。本研究では、水耕栽培用の液肥に赤色色素成分の含有量増加が期待できる候補化合物を添加し、赤茎ホウレンソウの栽培を行った。化合物の同定、定量は高速液体クロマトグラフィーと三連四重極型質量分析計（LC–MS/MS）を用いて行った。

【結果】まず、赤茎ホウレンソウから色素成分を抽出し、分析した結果をまとめて報告する。また、種々の化合物添加したホウレンソウサンプルからその色素成分の生合成量を増加させ、その分子機構を推定した。

[1] Watanabe et al. J. Agric. Food Chem., 2017, 65 (23), 4605–4610

Hydroponics, Biofunction, Spinach

発表責任者：渡辺祥（watanabe.sho.36z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A14a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A14 会場

イネいもち病菌における pyriculol 類生合成関連 aldo/keto reductase 遺伝子の機能解析
Analysis of an aldo/keto reductase gene involved in pyriculol biosynthesis

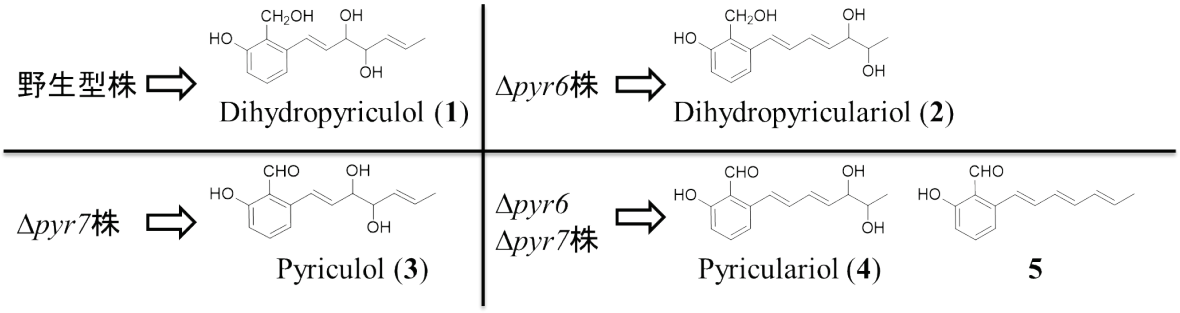
○古山 祐貴[1,2]、本山 高幸[2]、野川 俊彦[2]、清田 洋正[3]、鎌倉 高志[1]、長田 裕之[2]（[1]東理大院理工・応生、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[3]岡山大院・環境生命）
○Yuki FURUYAMA[1,2], Takayuki MOTOYAMA[2], Toshihiko NOGAWA[2], Hiromasa KIYOTA[3], Takashi KAMAKURA[1], Hiroyuki OSADA[2] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [3]Okayama Univ.)

【背景と目的】

Pyriculol は植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*（*Magnaporthe oryzae*）が生産するポリケタイド化合物である。Pyriculol はイネの葉に壊死斑形成を誘導することから病原性との関連が示唆されてきたが、自然界における役割は不明である。また、本菌は複数の pyriculol 類縁体を生産することが報告されているが、これらの生合成機構は明らかになっていない。我々はこれまで pyriculol 類の生合成機構及び pyriculol 類の生物学的役割を明らかにするために生合成遺伝子の解析を行ってきた。昨年度の大会において、pyriculol 類生合成遺伝子クラスター中の FAD-dependent monooxygenase 遺伝子である *PYR6* を破壊すると dihydropyriculol (**1**) から dihydropyriculariol (**2**) へと化合物生産が変化したことを報告した。今回は、PYR7 の役割を明らかにすることを目的に遺伝子破壊株における代謝産物解析を行い、PYR7 が PYR6 と共に生合成に関与していることを見出したので報告する。

【方法と結果】

ドメイン検索により PYR7 は aldo/keto reductase であると推定されるため、アルデヒド体である pyriculol (**3**) をアルコール体である **1** へ還元する反応への関与が予想された。このことを検証するために *PYR7* の破壊株を作出し、野生型株とともに 0.1% agar を添加した PDB 液体培地にて振とう培養を行った。その結果、*PYR7* 破壊株では予想通り **3** の生産が認められた。このことから PYR7 が実際に aldo/keto reductase として機能していることが示唆された。次に、昨年度の結果を踏まえ、*PYR6* と *PYR7* の二重破壊株では **2** のアルデヒド体である pyricullariol (**4**) が生産されると予想した。二重破壊株での代謝産物解析の結果、**4** と推定される化合物の生産が認められたため、PYR7 は **4** から **2** への変換にも関与していることが示唆された。さらに興味深いことに、この二重破壊株では中間体 **5** と推定される化合物の蓄積も認められた。他の生合成遺伝子破壊株においては **5** の蓄積は確認されていないことから、PYR7 は PYR6 と共に **5** の水酸化にも関与していることが示唆された。



Pyricularia oryzae, Secondary metabolism, Polyketide

講演番号：3A14a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A14 会場

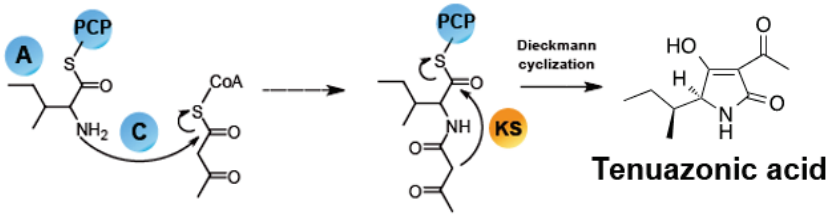
テヌアゾン酸の環状骨格形成を担うケトシンターゼドメインの結晶化解析

Crystallization analysis of ketosynthase domain that responsible for cyclic skeleton formation of tenuazonic acid

○尹 忠鉄[1]、西本 一希[2]、本山 高幸[1]、日野 智也[2]、永野 真吾[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]鳥取大院・工・化学生物）

○ChoongSoo YUN[1], Kazuki NISHIMOTO[2], Takayuki MOTOYAMA[1], Tomoya HINO[2], Shingo NAGANO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Grad. School of Eng., Tottori Univ.)

【背景及び目的】テヌアゾン酸は *Pyricularia oryzae*（イネいもち病菌）や *Alternaria* sp.などの植物病原性糸状菌が生産するかび毒の一種である。我々は以前の大会で今まで不明であったテヌアゾン酸の生合成遺伝子（*TAS1*）を *P. oryzae* より初めて同定し、テヌアゾン酸の生合成及び制御機構について報告した[1, 2]。TAS1 は糸状菌では初めて報告された NRPS-PKS hybrid 酵素であり、PKS 部分はケトシンターゼ（KS）ドメインのみで構成されている。この KS ドメインは系統学的解析から今まで報告されてない新規の酵素であり、一般的 KS ドメインが行う基質伸張反応は行わずにテヌアゾン酸の環状骨格を形成する環化反応のみを行う。今回、その反応メカニズムを明らかにするため KS ドメインの立体構造解析を行った。



【方法と結果】TAS1 の KS ドメインタンパク質は GST-tag を付加して大腸菌を宿主として発現させた。GST-KS 融合タンパク質は thrombin を用いて GST 部分を切断し、KS ドメインのみのタンパク質にして X 線結晶構造解析法により 2.37Å の分解能で立体構造を決定した。決定した分子表面には大きなくぼみがあり、底部に KS ドメインの活性残基として知られている Cys203, His346, Asn400 が位置していることからこのくぼみが活性部位であると考えられる。全体的構造は type I PKS の KS と似ているが基質ポケットの構造が大きく異なっている。一般的 type I PKS の KS は α-helix が基質ポケットの上部を覆うように存在しているが TAS1 の KS にはこの α-helix がないため基質ポケットが大きく広がっている。TAS1 の KS は機能的に環化反応を行うことや KS ドメインのみで構成されている点で type III PKS の KS に似ているが、系統解析の結果では異なる Clade に分類された。しかし、活性部位の活性残基は種類も立体的な位置も保存されている。TAS1 KS の基質であるイソロイシン・ジケチドをリガンドとしてドッキングシミュレーションを行った結果、リガンド結合部位の近傍に存在する Glu402 または His346 がプロトンを引き抜くことで環化反応が誘起されると推定している。

本研究の一部は，科研費及び農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

1) CS Yun, T Motoyama & H. Osada. 2015. *Nature communications* 6:8758.

2) CS Yun, T Motoyama & H. Osada. 2017. *ACS Chemical Biology* 12:2270

Tenuazonic acid, ketosynthase, crystallization

講演番号：3A14a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A14 会場

リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の機能解析

Mechanism of succinylation involved in reveromycin biosynthesis

○鬼頭 奈央子[1]、高橋 俊二[1]、佐藤 裕美[1]、奥村 英夫[2]、熊坂 崇[2]、長田 裕之[3] ([1]理研 CSRS ・天然物生合成、[2]高輝度光科学研究センター、[3]理研 CSRS ・ ケミカルバイオロジー)
○Naoko KITO[1], Shunji TAKAHASHI[1], Yumi SATO[1], Hideo OKUMURA[2], Takashi KUMASAKA[2], Hiroyuki OSADA[3] ([1]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [2]JASRI, [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】Reveromycin A (RM-A)は、破骨細胞選択的に低濃度でアポトーシスを誘導する活性を有する。RM-A 生合成の最終過程にはユニークな 3 級水酸基のサクシニル化反応が存在するが、この反応は強い生物活性付与に重要である。これまでに、3 つの酵素 RevK、RevL、RevM による複合反応が進行することが分かっている。RevL はアデニル化ドメインを持っており、フマル酸と ATP から fumaroyl-AMP を生成すると予想される。また、RevM は、酸化還元酵素と相同性を有していることから、fumaroyl-AMP を succinyl-AMP に還元する反応が予想される。これまでに、分子間の相互作用を理解するために RevL と RevM それぞれの単結晶構造解析を行ってきた。本研究では、得られた結晶構造をもとに RevL との相互作用領域に関与すると予想される RevM のアミノ酸残基をアラニン置換した変異酵素を作成し、分子間の induced fit に関与しているアミノ酸残基を同定することを目的とした。
【方法および結果】第一に、RevL と RevM の結晶構造から相互作用領域を予測し、変異を導入するアミノ酸残基の絞り込みを行った。次に、部位特異的変異導入手法により、標的のアミノ酸（21 箇所）をアラニン置換した。大腸菌 BL21(DE3)star に pET28b-His8-*revL*、pET28b-His8-*revM* および pET28b-His8-*revM* mutant を導入し、His-tag 融合タンパク質として RevL、RevM および各変異 RevM を異種発現・精製した。酵素反応基質として、Fumaroyl-AMP-RevL を調製後、精製した各変異 RevM を用いて NADH 消費を測定することにより反応解析を行った。また、SPR（表面プラズモン共鳴）により、RevL を固定化した Sensor Chip を用いて各変異 RevM との相互作用解析を行った。その結果、RevL との相互作用に関係しているアミノ酸残基 Ser41、Arg238、Arg251 を見いだすことができた。これらの結果についての詳細を報告する。

reveromycin, biosynthesis, succinylation

講演番号：3A14a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A14 会場

アニオンチャネルの部位特異的発現と覚醒物質の局在がアメリカネムノキの葉を開く運動に関与する

Site-specific expression of anion channel and localization of leaf-opening factor contribute to leaf-opening of *Samanea saman*

○竹内 優輔、及川 貴也、鷲山 研人、石丸 泰寛、上田 実 (東北大院理)
○Yusuke TAKEUCHI, Takaya OIKAWA, Kento WASHIYAMA, Yasuhiro ISHIMARU, Minoru UEDA (Tohoku Univ.)

マメ科植物は、朝に葉を開き、夜には葉を畳んで「眠る」日周性の葉のリズム運動（就眠運動）を行う。アメリカネムノキ（*Samanea saman*）は、古くから就眠運動研究のスタンダード植物として用いられてきた。既に我々は、葉の開閉運動に寄与するイオンチャネルを同定している（及川貴也ら，第 58 回日本植物生理学会年会，PF-53（2017））。今回我々は、このイオンチャネル発現の日周性変動から、これらのチャネルによる「葉を開く」運動の制御機構の解明を目指した。また、先行研究において同定された、アメリカネムノキの覚醒物質 cis-*p*-coumaroylagmatine を基に合成した蛍光プローブを用いて、この化合物が葉の運動に関与する仕組みの解明を目指した。

「葉を開く」運動には、葉の付け根部分に存在する運動細胞の、下面側と上面側の膨張/収縮が関与する。葉の運動とイオンチャネルの関連を明らかにするため、上下両面の各運動細胞におけるイオンチャネル遺伝子の経時的発現量解析を行った。その結果、アニオンチャネル *SsSLAH1* は、葉を開く時間帯においてのみ、下面側での発現量が上面側を大きく上回った（図 1a）。これにより、下面側のみでアニオンの放出が起こり、運動細胞が収縮する（図 1b）。一方、上面側では、*SsSLAH1* の発現量が低いため、収縮は起こらない。このように、下面側が上面側よりも相対的に縮むことで、「葉を開く」ことが明らかになった。

続いて、葉の運動と覚醒物質の関連を明らかにするため、cis-*p*-coumaroylagmatine に Rhodamine を修飾した蛍光プローブの合成と運動細胞の標識を行った。その結果、上面側運動細胞の核に特異的な Rhodamine の蛍光を得た。以上より、覚醒物質は、*SsSLAH1* の上面側特異的な発現抑制に関与し、葉を開かせると推定される（図 1c）。

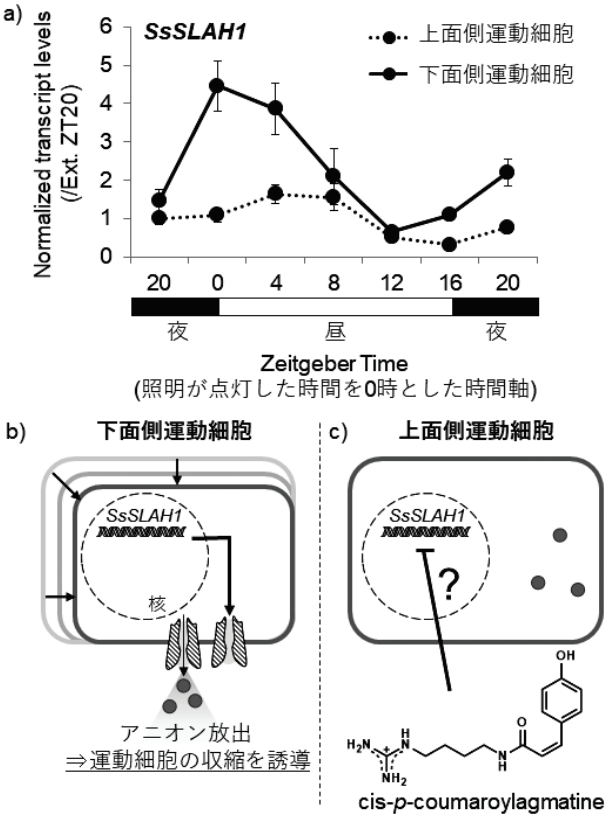


図 1　アニオンチャネルによる「葉が開く」運動の制御機構

nyctinastiy, anion channel, leaf-opening factor

発表責任者：上田実（ueda@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A14a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A14 会場

オスモライトであるアミン-N-オキシドの化学構造が酵素活性、安定性に及ぼす影響

Influence of chemical structure of amine-N-oxide on the activity and stability of enzymes

○青木 拓真、源嶋 龍太郎、中川 雄市、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Takuma AOKI, Ryutaro GENJIMA, Yuichi NAKGAWA, Kazuya KOUMOTO (Kounan Univ.)

［研究背景］
我々の研究室では、オスモライトの一つであるグリシンベタインを基体としたアナログライブラリーを合成してきた。それらは、構造依存的にその水和層から水溶性分子を排他し、結果として、酵素の反応速度の上昇や安定化を引き起こす興味深い現象を引き起こすことを報告してきた。本研究では、トリメチルアミン-N-オキシド（TMAO）を基体としたアナログライブラリーを新たに合成し、化学構造の違いによる酵素の活性化、安定化挙動について検討を行った。
［実験方法］
TMAO は和光純薬工業から購入したものを利用し、他のアミン-N-オキシドは、先行研究を参考に種々の 3 級アミンを過酸化水素で酸化することで合成した。ここで得られたアミン-N-オキシドライブラリーを用い、ベタインと同様に酵素活性化、安定化に及ぼす添加効果を、酵素反応実験を行い、反応初速度もしくは反応初速度比（Activity）として算出し、検討した。酵素としては、先行研究で使われているα-グルコシダーゼを用いた。また、TMAO を利用して pH の条件を変えたときの酵素の活性化、安定化の検討も行った。
［実験結果］
異なる長さの n-アルキル鎖を導入したアミン-N-オキシドが合成され、そのうち数種類で酵素活性化、安定化に及ぼす添加効果を検討した結果、アミンに導入されたアルキル鎖長に依存して、構造依存的、濃度依存的にα-グルコシダーゼを活性化させることが明らかとなった。その際、酵素を活性化させる最適添加濃度や最大活性比はベタインアナログとほぼ同程度であった。TMAO とたんぱく質との相互作用を解析している先行研究によると、TMAO は N-O の塩基型と N-OH の共役酸型によってタンパク質に対する安定化、不安定化挙動が異なることが明らかとなっている。酵素活性化においてそのような挙動が確認されるか、TMAO を添加剤として検討したところ、その pKa（7.8）に近く、共役酸の解離が始まる pH7.4 以上で、酵素の活性化が生じることが見出された。このような効果は、ベタインでは確認されず、アミン-N-オキシドが引き起こす特有の現象であることが明らかとなった。発表では、アナログライブラリーを用いた構造効果についても報告する予定である。

N-oxide, analogs, enzyme activity

発表責任者：甲元　一也（koumoto@center.konan-u.ac.jp）

講演番号：3A14a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A14 会場

がん代謝阻害剤スクリーニングと呼吸阻害作用解析

Screening of inhibitors affecting cancer metabolism and analysis of respiratory inhibitors

○室井 誠[1]、二村 友史[1]、青野 晴美[1]、川谷 誠[1]、関根 朋美[1]、野川 俊彦[1]、林田 莉奈[1,2]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大院・理工)
○ Makoto MUROI[1], Yushi FUTAMURA[1], Harumi AONO[1], Makoto KAWATANI[1], Tomomi SEKINE[1], Toshihiko NOGAWA[1], Marina HAYASHIDA[1,2], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

【背景・目的】がん代謝の機構を理解する為には、多様な阻害剤の取得・解析が有効である。我々はこれまでに、がん特異的代謝経路の解析やがん代謝阻害剤の作用機序解析のためにプロテオームとメタボローム を統合したオミクス基盤技術の開発を行ってきた。酸素消費量（OCR: oxygen consumption rate）と細胞外酸性化度（ECAR: extracellular acidification rate）の変化は、化合物のがん細胞の代謝への作用を知る重要なパラメータである。これらのパラメータを取得・プロファイリングすることによって、代謝に作用する多様な化合物の取得が期待される。そこで、化合物を添加した時の OCR、ECAR の変化、並びに、我々の基盤技術の一つであるプロテオームの変化を指標に、新規代謝阻害剤を探索する系を構築し、新規化合物を探索することを目的とした。さらに、得られた呼吸阻害剤についてセミインタクト系を用いた評価系を構築し、その作用を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】フラックスアナライザーを用いて、化合物処理 HeLa 細胞（$1x10^4$ cells/well）の OCR、ECAR について、薬剤処理後 1 時間経時的に追跡し、コントロールに対する変化の割合を算出し、評価した。セミインタクト評価系では、ジギトニン処理 HeLa 細胞に、電子伝達系の各複合体の基質（I: Pyruvate/malate, II: Succinate, III: Duroquinol, IV: TMPD/ascorbate）を加えて、OCR の変化をフラックスアナライザーで評価した。電子伝達系複合体 I の阻害活性は、NADH-CoQ reductase の活性を測定した。
【結果】解糖系、電子伝達系、グルタミノリシスなどの代謝阻害剤について、OCR、ECAR の変化を検討したところ特徴的なプロファイルが得られた。また、化合物探索の過程で得られた、Unantimycin A は、電子伝達系に作用する薬剤と同様なプロファイルが得られ、プロテオーム解析でも、その結果が支持された。さらに、セミインタクト評価系を用いて検討したところ、Unantimycin A の標的は複合体 III であることが示された。ついで、NPDepo ライブラリ用いて、代謝阻害剤を探索したところ、NPL40330 が見出された。NPL40330 は、セミインタクト評価系の解析、並びに、複合体 I の NADH-CoQ reductase への作用検討により、複合体 I の阻害剤であることが示された。

cancer metabolism, screening, respiratory inhibitor

講演番号：3A14a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A14 会場

がん代謝を阻害するプレニルフラボノイドの作用機序解析

A mode of action study of a prenylated flavonoid that inhibits cancer metabolism

○二村 友史[1]、青野 晴美[1]、佐竹 華子[1,2]、室井 誠[1]、川谷 誠[1]、野川 俊彦[1]、井本 正哉[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]慶應大・理工)
○ Yushi FUTAMURA[1], Harumi AONO[1], Hanako SATAKE[1,2], Makoto MUROI[1], Makoto KAWATANI[1], Toshihiko NOGAWA[1], Masaya IMOTO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Keio Univ.)

【背景・目的】多様性あるがん代謝を理解し、制御するためには、作用機序を異にするユニークな代謝阻害剤を数多く見出すことが重要である。我々はこれまでに酸素消費量（OCR: oxygen consumption rate）と細胞外酸性化度（ECAR: extracellular acidification rate）の変化パターンなどに着目した表現型スクリーニング法を構築した。またジギトニン処理細胞に電子伝達系複合体の基質を添加してミトコンドリアの呼吸活性を解析するセミインタクト評価系を構築し、薬剤作用機序の解析基盤を整備してきた。本研究では天然化合物資源から表現型スクリーニングによって見出した 6-プレニルナリンゲニン（6PN）の作用機序を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】セミインタクト評価系では、HeLa 細胞（$1x10^4$ cells/well）をジギトニン処理で膜透過性にし、電子伝達系の各複合体の基質（I: Pyruvate/malate, II: Succinate, III: Duroquinol, IV: TMPD/ascorbate）を加えて、OCR の変化をフラックスアナライザーで評価した。メタボローム解析ではトリプル四重極型 LC/MS を用い、ダイナミック MRM 法で 32 種類の代謝物を検出した。
【結果】理研天然化合物ライブラリーより表現型スクリーニングを実施し、6PN をミトコンドリア呼吸阻害剤として見出した（EC_{50} = 10 μM）。セミインタクト系での解析により本化合物は pyruvate/malate によって駆動する呼吸活性を選択的に阻害することを見出した。複合体 I の NADH 脱水素酵素活性を直接阻害することが考えられたが、単離ミトコンドリアを用いた検討では、酵素阻害活性は見られなかった。これらの結果より、6PN は TCA サイクルに影響を与えて NADH の供給を阻害し、間接的に複合体 I の活性を阻害する可能性が示唆された。LC-MS/MS を用いて解糖系や TCA サイクルに関わる代謝物の増減を網羅的に測定して、6PN 処理によって変化する代謝物の探索、および関連酵素に対する影響を検討している。

Cancer metabolism, Metabolomics, Prenylated flavonoid

講演番号：3A14a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A14 会場

酵母 tafazzin によるカルジオリピンのリモデリング反応の基質特異性

Role of acyl chain composition of phosphatidylcholine in tafazzin-mediated remodeling of cardiolipin in liposomes

○安部 真人、澤田 良樹、宇野 晋平、千ヶ崎 修平、奥 公秀、阪井 康能、三芳 秀人（京大院農）
○Masato ABE, Yoshiki SAWADA, Shinpei UNO, Shuhei CHIGASAKI, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI, Hideto MIYOSHI (Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【背景と目的】カルジオリピン（CL）は、ミトコンドリア内膜を構成する主なリン脂質の1つであり（図1）、種々の呼吸鎖酵素や膜輸送体の活性発現に必須である。CL はリモデリング系と呼ばれる脂肪酸鎖の組み換え機構により、不飽和度を獲得して本来の生理機能を獲得する。これまでにリモデリング系を担う酵素の同定は進められてきたものの、CL の不飽和度獲得がどのように制御されているのかは不明である。そこで本研究では、リモデリング系における mature CL 生成の最終段階はトランスアシラーゼ tafazzin が担うことに着目し、アシルドナーとなる PC 類の基質特異性を明らかにすることを目的とした。

【方法】PC の脂肪酸部を系統的に改変した一連の類縁体を合成した。酵母由来 tafazzin は、GST（グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ）融合タンパク質として大腸菌に発現させてアフィニティ精製し、GST タグを切断することで調製した。アシルトランスフェラーゼ活性の測定は、PC およびモノリゾ CL（アシルアクセプター）の混合物から作製したリポソームに、単離 tafazzin を添加することで生成する CL 類を検出することで評価した。リポソームはエクストルージョン法により粒子径を約 120 nm に揃えたものを用いた。生成 CL 類の定量は、ion pair HPLC 法により脂肪酸組成により分離したうえで、蒸発光散乱検出器を用いて行った。

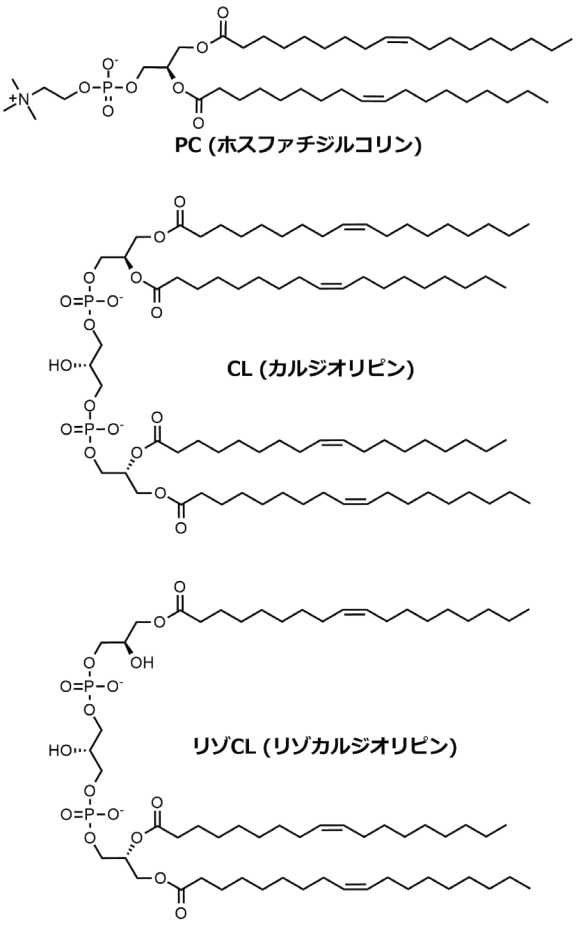


図1　研究対象とするリン脂質の化学構造

【結果】Tafazzin によるトランスアシラーゼ反応において、PC の *sn*-2 位のアシル鎖は *sn*-1 位のアシル鎖よりも優先したドナーとなることがわかった。一方、脂肪酸については、パルミトレイン酸やオレイン酸にみられる 9 位のシス型二重結合が必須であることが初めて明らかになり、トランス型や 5 位または 13 位のシス型二重結合に改変するとアシルドナーにはならなかった。以上の結果から、tafazzin による基質特異性の存在が明らかになった。このことは、「tafazzin に基質特異性はなく、熱力学的な要因によって CL の脂肪酸組成が決定する」と考える熱力学的リモデリング仮説を支持しない。

Cardiolipin, Phosphatidylcholin, Remodeling

講演番号：3A14a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A14 会場

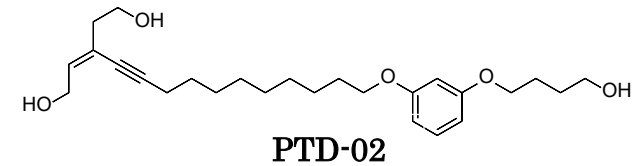
出芽酵母ミトコンドリアの VDAC を阻害するペンテンジオール類縁体の作用機構研究
Mode of action study of pentenediol derivatives against VDAC in Saccharomyces cerevisiae mitochondria

○運天 優歩[1]、村井 正俊[1]、一丸 直哉[1]、山本 武範[2]、篠原 康雄[2]、三芳 秀人[1]([1]京大院農・応用生命、[2]徳島大・先端酵素研)
○Yufu UNTEN[1], Masatoshi MURAI[1], Naoya ICHIMARU[1], Takenori YAMAMOTO[2], Yasuo SHINOHARA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokushima Univ.)

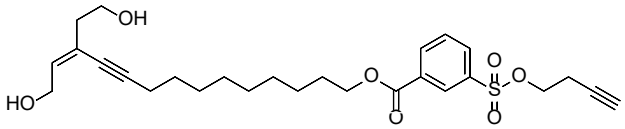
【背景・目的】ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル（voltage-dependent anion channel、VDAC）は、19 本の β シートで構成される分子質量約 30 kDa のバレル型タンパク質であり、ミトコンドリアと細胞質の間でのイオンや代謝物の出入りを制御している。これに加え、VDAC はミトコンドリア外膜や内膜に存在する様々なタンパク質と相互作用することで、ミトコンドリアのエネルギー代謝に深く関わっているとされるが、VDAC の機能全般に関する統一的な理解は得られていない。その要因として、VDAC に対する特異的阻害剤が発見されていなかったことが挙げられる。

我々は、出芽酵母ミトコンドリア外膜からの ADP/ATP 透過を指標にして VDAC 特異的阻害剤の探索を行い、ユニークなペンテンジオール構造を分子左端に持つ化合物群（PTD 類、図 1）が、ATP 排出を強く阻害することを見出した。PTD 類はミトコンドリア内膜上に存在する呼吸鎖酵素や ATP 合成酵素、ADP/ATP 輸送体には全く阻害効果を示さず、外膜上の VDAC を介した ADP/ATP の透過を特異的に阻害する可能性が強く示唆された。本研究では、PTD 類を鋳型として ligand-directed tosyl chemistry（トシル化学）に供するリガンド分子を合成し、VDAC と PTD 類の直接的な相互作用を実証することによって、その作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】PTD 類を鋳型として合成したリガンド分子(tPTD-01)の構造を図 1 に示した。tPTD-01 は、タンパク質の位置特異的化学修飾法の一つであるトシル化学を利用して、末端アルキンを VDAC の結合部位に存在する求核性アミノ酸残基に転移させることを意図して分子設計した。出芽酵母ミトコンドリアを tPTD-01 とインキュベートし、末端アルキンを足場としてクリックケミストリーを利用して蛍光発色団 TAMRA を導入した。SDS-PAGE でタンパク質を解析したところ、VDAC の分子質量に相当する 30 kDa 付近に明瞭な蛍光シグナルがシングルバンドで観察された。このタンパク質をヒドロキシアパタイトカラムで精製し、そのトリプシン消化物を精密質量分析に供したところ、VDAC1 と同定された。また、出芽酵母 VDAC1 欠損株(Δ*por1*)から単離されたミトコンドリアでは、tPTD-01 による位置特異的化学修飾は全く認められなかった。



PTD-02



tPTD-01

図 1. 本研究で用いた PTD 類の構造

voltage-dependent anion channel, mitochondria, ligand-directed tosylate chemistry

発表責任者：運天 優歩（unten.yufu.77a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A14a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A14 会場

ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン類の作用機構研究

Mechanism of the inhibition of mitochondrial ADP/ATP carrier by epoxycyclohexenedione-type compounds

○青山 綾希、村井 正俊、一丸 直哉、三芳 秀人 (京大院農)
○Ayaki AOYAMA, Masatoshi MURAI, Naoya ICHIMARU, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体(AAC)は、ミトコンドリア内膜上で ADP と ATP の交換反応を行う分子質量約 30 kDa の膜輸送体であり、ミトコンドリアで生産された ATP を細胞質へ供給する役割を担っている。AAC は呼吸鎖酵素や ATP 合成酵素とともに、細胞のエネルギー代謝の要となる膜輸送体であるため、AAC の特異的阻害剤に関する研究は、エネルギー代謝を制御する新規な薬剤の開発研究に資するところが大きい。これまでに多数の特異的阻害剤が見出され、抗寄生虫薬や殺虫・殺菌剤などの標的分子としての地位が確立されている呼吸鎖電子伝達酵素とは対照的に、AAC に特異的に作用する阻害剤として報告されているのはボンクレキン酸類（BKA）とカルボキシアトラクトシド類(CATR)の 2 種類のみである。当研究室では、ウシ心筋ミトコンドリア AAC による[^{14}C]ADP の取込みを評価するアッセイ系を用いて新規阻害剤を探索する過程で、epoxycyclohexenedione 類（ECH 類、AY59, 図 1）が低濃度で AAC を阻害することを見出した。本研究では、ECH 類の作用機構を解明することを目指した。

【方法・結果】ECH 類はエポキシ基とα,β-不飽和カルボニル基の 2 箇所の求電子性反応点を持つため、AAC の阻害には求核性アミノ酸残基との共有結合形成が関わっている可能性が高い。そこで、アルキル側鎖にクリックケミストリーを指向した末端アルキンを持つ ECH 誘導体（AY120、図 1）を合成した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）を AY120 存在下でインキュベートし、2 次タグとなる蛍光タグ(TAMRA-N_3)をクリックケミストリーによって導入したところ、AAC の分子質量に相当する約 30 kDa 付近のタンパク質に単一の蛍光バンドが観察された。また、システイン修飾剤である *N*-エチルマレイミド（NEM）で、AAC 表面上の 3 箇所のシステイン(Cys57, Cys160, Cys257)のうち、Cys57 を選択的に修飾した場合、AY120 による化学修飾が顕著に抑制されたことから、Cys57 が主たる修飾部位であることが強く示唆された。また、特筆すべき現象として、より高濃度(50-100 μM)の ECH 類でウシ心筋 SMP を処理すると、AAC の顕著な凝集が誘導され、SDS-PAGE のゲル上から AAC 単量体のバンドは完全に消失した。このような凝集誘導効果は、BKA や CATR では認められない極めてユニークな現象である。ECH 類による AAC 選択的な凝集誘導は、NEM 処理によって抑制されたため、システイン修飾に起因することが示唆された。

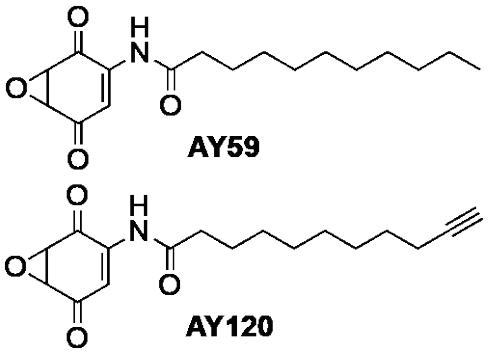


図 1. 代表的な ECH 類(AY59)および ECH プローブ(AY120)の構造.

ADP/ATP carrier, mitochondria, protein aggregation

講演番号：3A14a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A14 会場

がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物のスクリーニング
Screening for small-molecule inducers of reactive oxygen species
○河村 達郎[1,2]、WILKE Julian[1,2]、渡辺 信元[1,3]、ZIEGLER Slava[2]、WALDMANN Herbert[2]、長田 裕之[1,4] ([1]理研 CSRS・理研-マックスプランク連携、[2]マックス・プランク分子生理学研究所、[3]理研 CSRS・生理活性物質探索、[4]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Tatsuro KAWAMURA[1,2], Julian WILKE[1,2], Nobumoto WATANABE[1,3], Slava ZIEGLER[2], Herbert WALDMANN[2], Hiroyuki OSADA[1,4] ([1]RIKEN-MPI Joint, RIKEN CSRS, [2]MPI Mol. Physiol., [3]Bio-Active Comp. Discov., RIKEN CSRS, [4]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【背景・目的】がん細胞では正常な細胞と比べて活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)の基礎レベルが高いため、さらなる酸化ストレスの誘導による細胞死誘導が 1 つのがん治療戦略として注目されてきた。一方、ROS は量・種類・局在に応じて細胞増殖や細胞死など様々な細胞応答を引き起こすため、細胞のレドックス制御機構や ROS の役割については未解明な点も多い。そこで本研究では、がん細胞のレドックス制御系のさらなる理解と制御を目的とし、がん細胞に ROS 産生を誘導する化合物のスクリーニングを行った。
【結果】ROS 検出試薬として CM-H_2DCFDA を用い、ヒト骨肉腫 U-2 OS 細胞の ROS レベルを測定するハイスループットなアッセイ系を構築した。そしてこのアッセイ系を用いることにより、ドイツ・マックスプランク分子生理学研究所の 186,117 化合物のスクリーニングを行った結果、704 化合物に強い ROS 産生誘導活性を見出した。ヒットした 704 化合物が細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンのレベルに与える影響を解析したところ、一部の化合物はグルタチオン枯渇誘導活性を示し、強いグルタチオン枯渇誘導活性を有する化合物のいくつかは 4,5-dihalo-2-methylpyridazin-3-one (DHMP)あるいは 2,3,4,5(6)-tetrachloro-6(5)-methylpyridine (TCMP)を共通部分構造として有していた。これら DHMP, TCMP 含有化合物は細胞のグルタチオン枯渇、ROS 産生の誘導のみでなく、同濃度域で細胞毒性を示した。さらに、DHMP や TCMP を含む化合物は *in vitro* で酵素非存在下において還元型グルタチオンのチオール基と共有結合することを見出した。DHMP の一種である 4,5-dichloro-2-methylpyridazin-3-one や TCMP に関連した 2,3,4,5-tetrachloropyridine を含む化合物の細胞毒性の報告はあったもののその作用機序は不明であったが、本研究により DHMP, TCMP 含有化合物が還元型グルタチオンと直接結合し、グルタチオン枯渇、ROS 産生を伴う細胞死を誘導することを明らかにした。本研究で見出した DHMP あるいは TCMP 含有化合物が細胞機能解析のためのツールとなることが期待される。

reactive oxygen species, glutathione, cancer

講演番号：3A14a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A14 会場

がん代謝研究を加速するオミックス解析基盤の構築

Development of proteomics- and metabolomics-based approaches for cancer metabolism study

○佐竹 華子[1,2]、二村 友史[1]、室井 誠[1]、野川 俊彦[1]、川谷 誠[1]、井本 正哉[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]慶應大・理工)
○Hanako SATAKE[1,2], Yushi FUTAMURA[1], Makoto MUROI[1], Toshihiko NOGAWA[1], Makoto KAWATANI[1], Masaya IMOTO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Keio Univ.)

【背景・目的】がん細胞は低酸素・低栄養などのストレス環境で生存するため、特有なエネルギー代謝経路を獲得していると言われている。我々はこれまで、薬剤の細胞応答を解析するシステムとしてプロテオミクスを基盤とした ChemProteoBase システムを構築してきた。本研究では、二次元電気泳動上のスポット情報をもとに ChemProteoBase を高度化し、代謝関連酵素にフォーカスしたターゲットプロテオミクスの開発を試みた。また LC-MS/MS を用いて解糖系や TCA サイクルに関わる代謝物を網羅的に検出するメタボローム解析法を構築しつつある。本発表では、がん特異的代謝経路の解析やがん代謝阻害剤の作用機序解析に資するプロテオームとメタボロームを統合したオミクス基盤技術の開発を目的とした。
【方法】プロテオーム解析は HeLa 細胞を薬剤添加 18 時間後に回収し、二次元電気泳動をベースとした 2–D DIGE のシステムを用いて発現解析を行った。各ゲルで共通して見られる 296 スポットについて量変動を解析した。また MALDI-TOF-MS あるいは四重極型 LC-MS 解析でスポットのタンパク質同定を行った。メタボローム解析はトリプル四重極 LC-MS システムを用い、ダイナミック MRM 法で代謝物を検出した。細胞試料は、細胞を内部標準物質含有メタノールで破砕した後、限外ろ過フィルターで得られたろ液を濃縮して調製した。
【結果】ChemProteoBase で利用する 296 スポットのうち 274 のスポット同定を完了した。この中には、解糖系に関わるタンパク質が 8 種、TCA サイクルに関わる酵素が 9 種類含まれていた。またこれらのタンパク質の変動をスコア化し、エネルギー代謝に関わるタンパク質増減の傾向を簡易的に評価できるようにした。MAPK 経路や PI3K/mTOR 経路、HIF-1 などは、解糖系タンパク質の発現を制御することが知られている。そこで、これらの阻害剤を添加した細胞のプロテオーム解析を行ったところ、予想通り解糖系タンパク質の減少が観察された。メタボロミクスの構築に際しては、解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、ヌクレオチド、アミノ酸など数十種類の代謝物の標品を用い、代謝物のイオン化の是非、MS/MS 条件の検討、MRM での定量性、を確認し、32 種類の代謝物を一斉解析する系を構築した。解糖系阻害剤である 2-DG を添加した細胞のメタボロームを解析したところ、解糖系代謝物の減少が観察され、本系が阻害剤の作用解析に適応可能であることが示された。

cancer metabolism, proteomics, metabolomics

講演番号：3A14a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A14 会場

呼吸鎖複合体-I におけるアミロライド類の結合部位の同定

Identification of the binding site of amilorides in respiratory complex I

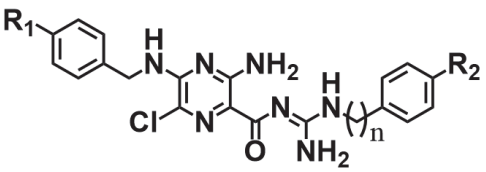
○木村 洋則、村井 正俊、三芳 秀人（京都大院農・応用生命）
○Hironori KIMURA, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である呼吸鎖複合体-I（NADH-キノン酸化還元酵素）は、基質の酸化還元を担う親水性ドメインと、プロトン輸送を担う膜ドメインから構成される膜タンパク質複合体である。クライオ電顕で解かれたウシ心筋複合体-I の構造を参照すると、キノン結合部位は、入口の内径約 6Å、奥行き約 30Å の狭く細長い洞窟様の空間を形成し（洞窟モデル）、アセトゲニンやキナゾリンなどの特異的阻害剤もこの空間に収容されると考えられている。

Na^+/H^+-アンチポーターの代表的な阻害剤であるアミロライド類は、複合体-I に対しても弱い阻害活性を示すことが知られており、複合体-I の膜ドメインを構成するアンチポーター様サブユニット(ND2, ND4, ND5)に結合すると考えられてきたが、当研究室での光親和性標識実験によって、アンチポーター様サブユニットではなく、キノン結合部位を構成する 49 kDa サブユニットに結合することが判明した[*1*]。本研究では、^{125}I 標識した光反応性アミロライド類を新たに合成し、その結合部位を詳細に同定することで、呼吸鎖複合体-I のキノン（阻害剤）結合部位の構造と機能に関する新たな知見を得ることを目的とした。

【方法と結果】光反応性アミロライド（[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6）の構造を図 1 に示した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子を実験材料として光親和性標識実験を行ったところ、アミロライド類のトキソフォアとなるピラジン環近傍（R_1）にアジド基を持つ[^{125}I]PRA3 と[^{125}I]PRA5 は、キノン結合部位を構成する 49 kDa サブユニットの N 末端領域(L125-E143)を特異的に標識することがわかった。一方、分子末端（R_2）にアジド基を持つ[^{125}I]PRA4 と[^{125}I]PRA6 は、“39 kDa”と呼ばれるサブユニットを標識した。

ウシ心筋複合体-I の構造を参照すると、アミロライド類の結合部位として同定した 2 つの領域は、キノン結合ポケットとは一致していない。しかし、キナゾリンなどの典型的な複合体-I 阻害剤を過剰量共存させることで、[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6 による光親和性標識は強く抑制された。以上の結果は、標識を受けた 2 つの領域は互いに隣接した位置関係にあり、”洞窟モデル”とは必ずしも一致しない。



[^{125}I]PRA3 (n=4): R_1=N_3, R_2=^{125}I
[^{125}I]PRA4 (n=4): R_1=^{125}I, R_2=N_3
[^{125}I]PRA5 (n=6): R_1=N_3, R_2=^{125}I
[^{125}I]PRA6 (n=6): R_1=^{125}I, R_2=N_3

図 1．光反応性アミロライドの構造

1) Murai *et al.* (2015) *Biochemistry* **54**, 2379-2746.

respiratory complex I, amiloride(s), photoaffinity labeling

講演番号：3A14a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A14 会場

コレラ菌 Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素における阻害剤結合部位の同定
Identification of the inhibitor binding site in the Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○伊藤 剛[1]、二ノ倉 聡[1]、村井 正俊[1]、北隅 優希[1]、BARQUERA Blanca[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大院・農、[2]レンセラー工科大・生物科学)
○ Takeshi ITO[1], Satoshi NINOKURA[1], Masatoshi MURAI[1], Yuki KITAZUMI[1], Blanca BARQUERA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】Na^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、基質の酸化還元と共役したNa^+の能動輸送を行う膜タンパク質複合体である。コレラ菌（*Vibrio cholerae*）や緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）など、ATP 合成の駆動力としてNa^+の濃度勾配を利用する微生物に特有の NADH 脱水素酵素である。Na^+-NQR は、哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖のH^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）とは進化的にも構造的にも全く異なるため、Na^+-NQR のメカニズム研究の進展は、本酵素を標的分子とする選択性に優れた抗菌剤の開発研究に資するところが大きい。

2014 年にコレラ菌由来の Na^+-NQR（分子質量約 200 kDa, サブユニット数 6 個（NqrA～F））の X 線結晶構造が報告されたが、メカニズム解明の鍵となるキノン結合部位の同定には至らなかった。従来、Na^+-NQR の阻害剤としては、HQNO などの市販オーラシン類が使われてきたが、その阻害活性は μM オーダーとさほど強くなかった（図 1)。そこで、強力な阻害活性を発揮するオーラシン類を発掘し、光親和性標識法によって阻害剤の結合部位を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】コレラ菌から単離・精製した Na^+-NQR を用いて、所属研究室が保有するオーラシン類ライブラリーについてスクリーニングを進め、HQNO の約 1000 倍強力なオーラシン D-42 を見出した（AD-42, 図 1)。AD-42 をテンプレートとして、キノロン環上あるいは側鎖末端に光反応性基（アジド基）を導入した光反応性オーラシン[^{125}I]PAD-1 および[^{125}I]PAD-2 をそれぞれ合成した（図 1)。

コレラ菌 Na^+-NQR に対して[^{125}I]PAD-1 あるいは[^{125}I]PAD-2 を用いて光親和性標識実験を行った結果、両化合物とも NqrB サブユニットを特異的に標識した。続いて、[^{125}I]PAD-1 あるいは[^{125}I]PAD-2 で標識した NqrB サブユニットを単離し、プロテアーゼによる徹底消化を行った。その結果、 [^{125}I]PAD-1 および[^{125}I]PAD-2 は NqrB の N 末端領域の Arg43-Lys54 と Trp23-Gly89 をそれぞれ特異的に標識することがわかった。X 線結晶構造に基づくと、この領域はキノンの結合部位と予想される“solvent-accessible cavity”と呼ばれる空間の一部を構成しているが、阻害剤は必ずしもキノンと拮抗的に作用するものではないことがわかった。

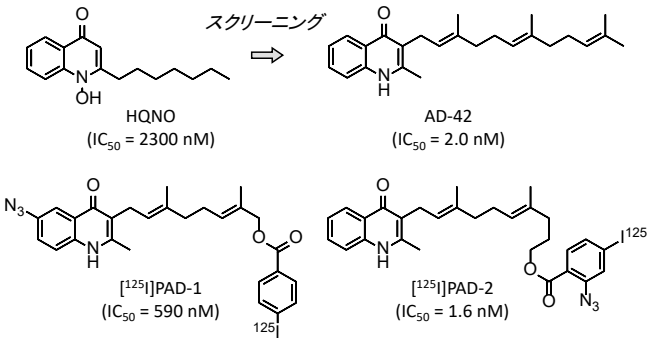


図 1. 本研究で用いたオーラシン類の構造.

Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase, aurachin, photoaffinity labeling

講演番号：3A14a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A14 会場

代謝産物を基体に合成されたベタイン型添加剤を利用する ELISA の低コスト化、高感度化

Low-cost and high sensitivity of ELISA detection utilizing betaine-type additives derived from naturally occurring metabolites

○三宅 子龍、高木 琴味、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shiryou MIYAKE, Kotomi TAKAGI, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ.)

［研究背景］

医療診断や食品管理の分野では、夾雑物を多く含む生体試料の中から試料に含まれる極微量の成分（疾患マーカーやアレルゲンなど）を高感度に検出する ELISA（Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay）が使われている。ELISA では、抗原抗体反応を用いて微量成分を検出する。抗原抗体反応のもつ高い親和性と特異性から、分離操作を経ずに、多検体を同時解析できる利点をもつ反面、検出感度やコスト、操作時間などに課題も多くあった。これまでに標識酵素を複数導入する高感度化や防汚素材のコーティングによるノイズの低減、半導体ナノ粒子を使った新しい増幅法の開発なども行われてきたが、大きく方法論を改善するには至っていない。本研究では、我々の研究室で開発した特異な水和層をもち、親水性物質を排他し、水の活量を低下させることで酵素活性化、安定化を促すベタイン型添加剤を用い、ELISA の操作における一次抗体のプレートへの吸着、抗原抗体反応の親和性向上などに効果を発揮するか検討を行った。

［研究方法］

ELISA は Life Technologies 社の Human TNF-α（CytoSet™）を、ベタイン型添加剤は研究室で開発したグリシンベタインのアンモニウム基のメチル基をエチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基に変えたアナログを用いた。

［研究結果］

まず、ELISA における一次抗体のプレートへの吸着に及ぼすベタイン型添加剤の添加効果を検討した。ベタイン型添加剤を 0-200 mM の濃度で添加し、一次抗体の吸着挙動を評価したところ、25―50 mM の添加で一次抗体の吸着量が二倍に増加した。吸着平衡定数が 1.7 倍大きくなり、同じ一次抗体の結合量を達成するのにその使用量を 63%に減らすことができることが明らかとなった（低コスト化）。同様に、抗原抗体反応においても 10―25 mM の添加で二倍程度のシグナル増強を達成することに成功し、低濃度の極微量成分の検出が精度良くできることが期待される。発表では、ベタイン型添加剤の構造効果やその他、解析結果、各ステップにおける操作時間に及ぼす影響についても報告する予定である。

ELISA, Betaine, Sensitivity

発表責任者：甲元　一也（koumoto@center.konan-u.ac.jp）

講演番号：3A14p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A14 会場

環状ペプチドマルホルミンが賦活化する細胞性血栓溶解には RSK1 の活性化が関与する
Involvement of RSK1 activation in malformin-enhanced cellular fibrinolytic activity

○小泉 幸央[1]、長井 賢一郎[2]、高 立娜[1]、山口 智和[1]、夏井 美幸[1]、今井 由美子[1]、蓮見 惠司[3]、杉山 俊博[1]、久場 敬司[1] ([1]秋田大院医、[2]北里大薬、[3]農工大院農)
○Yukio KOIZUMI[1], Kenichiro NAGAI[2], Lina GAO[1], Tomokazu YAMAGUCHI[1], Miyuki NATSUI[1], Yumiko IMAI[1], Keiji HASUMI[3], Toshihiro SUGIYAMA[1], Keiji KUBA[1] ([1]Akita Univ. Grad. Sch. Med., [2]Kitasato Univ. Fac. Pharm., [3]Tokyo Noko Univ. Grad. Sch. Agr.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus niger* が生産する環状ペンタペプチド、マルホルミン A_1（MA_1）は植物に対する催奇形性物質として当初見出されたが、我々は血栓溶解を賦活化する低分子化合物の探索過程で本物質を再発見してきた。MA_1 はウロキナーゼ発現細胞に作用し、プラスミン活性を増加させるが、詳細な細胞内調節機構は不明であった。最近行った網羅的なタンパク質アレイ解析から p90 ribosomal S6 kinase（RSK）ファミリーの活性化が MA_1 の血栓溶解賦活化に関与することが示唆された。今回、MA_1 の活性発現に関与する RSK アイアソフォームの同定、RSK 活性化機構の分析、プラスミン活性上昇を導く線溶因子の同定を目的に実験を行った。
【方法】RSK アイアソフォームの同定にはアイソフォームノックアウト U937 細胞を用いた。ノックアウトはレンチウイルス型 CRISPR/Cas9 ベクターを導入して作成し、シングルセルクローンを単離した。MA_1 誘導体は固相ペプチド合成によって合成した。*In vitro* 血栓溶解試験は、[^{125}I]標識フィブリンをコートしたマイクロプレート上でヒト血漿及び U937 細胞を反応後、反応上清に遊離した[^{125}I]標識フィブリン分解物の定量により評価した。
【結果】CRISPR/Cas9 を用いて RSK アイソフォーム（RSK1 及び RSK2）ノックアウト細胞クローンを単離した。ノックアウト細胞を用いて *In vitro* 血栓溶解試験を行った結果、RSK 1 ノックアウト特異的に MA_1 の血栓溶解賦活化を抑制した。これは RSK1 の活性化が MA_1 の血栓溶解賦活化に関与することを示している。これまでの構造活性相関研究で明らかになった MA_1 誘導体の血栓溶解賦活化活性と RSK1 の活性化との間には相関関係が確認された。RSK1 は MAP キナーゼ経路の構成因子であることから、上流にある ERK1/2 及び MEK1/2 に対する MA_1 の影響を調べた結果、MA_1 は ERK1/2 及び MEK1/2 の活性化を誘導することがわかった。また、MA_1 による RSK1 と MEK1/2 の活性化が MEK 阻害剤である PD98059 によって阻害されたことから、MA_1 は MEK1/2→ERK1/2→RSK1 経路の活性化を誘導することがわかった。MA_1 が誘導する線溶因子を調べた結果、MA_1 はウロキナーゼ遺伝子の発現や分泌を上昇させることがわかった。これらの作用は、RSK1 ノックアウト細胞で抑制された。以上の結果から、MA_1 は MAP キナーゼ経路の活性化を介し、ウロキナーゼの発現上昇を導き、細胞性血栓溶解作用を賦活化させることが明らかとなった。今回の結果は、RSK1 の活性化が新規な血栓溶解療法の分子標的であることを示唆するものであった。

malformin, fibrinolysis, RSK

発表責任者：小泉幸央（ykoizumi@med.akita-u.ac.jp）

講演番号：3A14p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A14 会場

マキ科植物由来成分 nagilactone E が出芽酵母の細胞形態に及ぼす影響
Effects of nagilactone E, derived from Podocarpaceae, on the cell morphology of *Saccharomyces cerevisiae*

○林 謙吾[1]、尾山 昌弘[2]、山口 良弘[1,3]、荻田 亮[1,4]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・理・生物、[3]阪市大・複合先端、[4]阪市大・健康・研セ)
○Kengo HAYASHI[1], Masahiro OYAMA[2], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,3], Akira OGITA[1,4], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Dept. Biol., Fac. Sci., Osaka City Univ, [3]OCARINA, Osaka City Univ., [4]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

ナギラクトン類は、マキ科マキ属植物のナギ（*Podocarpus nagi*）の根皮から得られるノルジテルペン類の一種であり、植物に対する生育阻害作用を示し、シカなどの草食哺乳動物に対する摂食忌避作用も示すことが報告されている。ナギラクトン類の中でも、ナギラクトン E は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や病原性真菌の一つである *Candida albicans* に対して抗真菌作用を示し、フェニルプロパノイドの一種であるアネトールやイソサフロールと併用した場合、その作用が増幅されることが先行研究により明らかにされている。しかし、ナギラクトン E 自身の抗真菌作用や相乗効果が起こるメカニズムは不明である。

本研究は出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4741 株を用いてナギラクトン E の作用メカニズムを解明することを目的とした。まず、ナギラクトン E で酵母を処理し、コロニーカウント法により生菌数の変化を測定したところ、薬剤処理 4 時間後以降において、生菌数の減少が確認された。また、ナギラクトン E 処理 72 時間後の酵母をイオン交換水で洗浄した後、顕微鏡で観察したところ、細胞の変形及び細胞質の漏出が観察された。この結果は、酵母の細胞壁がナギラクトン E により脆弱になった可能性を示唆している。現在、(1,3)-β-glucan を特異的に染色する aniline blue 蛍光色素を用いて、ナギラクトン E によって(1,3)-β-glucan 合成酵素活性が阻害されるかを検討中である。

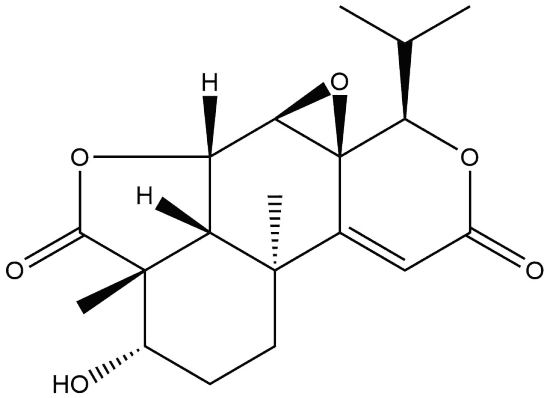


図　ナギラクトン E の構造

nagilactone E, antifungal, cell morphology

講演番号：3A14p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A14 会場

クアシノイド類の脂肪分解促進活性に関する構造活性相関研究

Structure-activity relationship study of a lipolytic activity of quassinoids

○岩田 稜平[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Ryohei IWATA[1], Eisuke KATO[2], Jun KAWABATA[2] ([1]Hokkaido University School of Agriculture, [2]Hokkaido University Research Faculty of Agriculture)

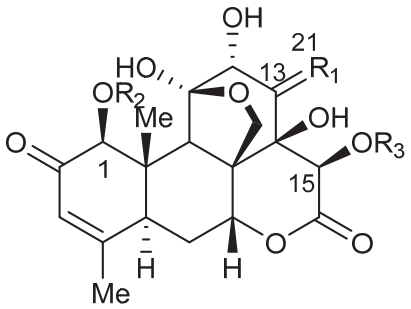
【目的】

肥満 は 2 型糖尿病や脂質異常症、心筋梗塞など様々な疾患の原因となる と考えられており、その治療法を開発、改良することは極めて重要な課題である。体内で脂肪細胞内に貯蔵されているトリグリセリド は、細胞内リパーゼによって脂肪酸とグリセロールに分解された後代謝される 。したがって、この脂肪分解を促進することは肥満改善につながると考えられる。

当研究室では 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪分解促進活性物質の探索研究を行い、eurycomanone (**1**) や brucein A 等のクアシノイド類を活性物質として見出した。[1, 2)] しかし、これらのクアシノイド類のどのような構造が活性に重要であるかはわかっていない。そこで、我々はクアシノイド類の脂肪分解促進活性に関する構造活性相関研究を行った。

【方法及び結果】

eurycomanone (**1**) の C13,21 オレフィン部誘導体 **4~6** を合成し、以前単離した化合物 **2**, **3** とあわせて活性を評価したところ、C21 が紙面奥側にある **2**, **6** は活性を示し、紙面手前側にある **4**, **5** は活性を示さなかった。また、ジヒドロキシ体 3 も活性を示さなかった。従って、**1** の標的分子との相互作用においては、C21 付近の立体配置 が重要であり、化合物 **3~5** は立体障害などによる影響のため活性を示さなかったと予想される。また水酸基の重要性を検討 するため 1-OH メチル化体 **7** 、1-OH, 15-OH アセチル化体 **8~10** を合成した。このうち **7** は活性を示さなかった。 **8~10** については現在活性を検討している。



1: R_1= CH_2, R_2,R_3= H
2: R_1= β-epoxide, R_2,R_3= H
3: R_1= β-OH, α-CH_2OH, R_2,R_3= H
4: R_1= α-epoxide, R_2,R_3= H
5: R_1= β-methyl, R_2,R_3= H
6: R_1= α-methyl, R_2,R_3= H
7: R_1= CH_2, R_2= Me, R_3= H
8: R_1= CH_2, R_2= Ac, R_3= H
9: R_1= CH_2, R_2= H, R_3= Ac
10: R_1= CH_2, R_2= Ac, R_3= Ac

1) L. Lahrita *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4829-4834.
2) 加藤ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C13p05

quassinoid, lipolysis, obesity

発表責任者：加藤　英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A14p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A14 会場

神経保護物質ネオエキヌリン A の結合タンパク質の同定
Identification of proteins that bind to the neuroprotective agent neoechinulin A
○紙透 伸治[1]、姫野 なつみ[2]、鶴川 幸音[1]、草柳 友恵[2]、竹野 正洋[2]、鎌倉 高志[2]、倉持 幸司[2]、菅原 二三男[2] ([1]麻布大獣医、[2]東理大理工)
○ Shinji KAMISUKI[1], Natsumi HIMENO[2], Yukine TSURUKAWA[1], Tomoe KUSAYANAGI[2], Masahiro TAKENO[2], Takashi KAMAKURA[2], Kouji KURAMOCHI[2], Fumio SUGAWARA[2] ([1]Azabu Univ., [2]Tokyo Univ. of Sci.)

ネオエキヌリン A は真菌から単離されたインドールアルカロイドであり、抗酸化活性、抗炎症活性など様々な生理活性を示す。我々は以前に、この化合物が神経保護作用を示すことを明らかにしている。ネオエキヌリン A は神経細胞に分化させたラット副腎褐色細胞腫 PC12 の 3-moropholinosydononimene (SIN-1) による細胞死を抑制する。SIN-1 は、活性窒素であるパーオキシナイトライト（$ONOO^-$）を発生させ細胞死を誘導する。活性窒素による神経細胞傷害は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連性が知られている。そこで本研究では、ネオエキヌリン A がもつ神経保護作用のメカニズム解明を目的とし、ファージディスプレイ法によりネオエキヌリン A 結合タンパク質を探索した。

神経細胞に分化させた PC12 由来の cDNA から、ファージライブラリーを構築した。このファージライブラリーを、ビオチン化ネオエキヌリン A を固定化したニュートラアビジンプレートに加え、ネオエキヌリン A が結合するファージを選抜した。その結果、chromogranin B と glutaredoxin 3 の断片を提示する 2 種類のファージクローンが得られた。chromogranin B は神経内分泌細胞の分泌顆粒に存在するタンパク質であり、glutaredoxin 3 はチオール-ジスルフィド酸化還元酵素の一つである。これら二つのタンパク質をネオエキヌリン A の標的タンパク質候補として、さらに解析を進めた。

Chromogranin B と glutaredoxin 3 二つのタンパク質とネオエキヌリン A の相互作用を、水晶発動子マイクロバランス（QCM）法を用いて解析した。ビオチン化ネオエキヌリン A を固定化したセンサーチップに二つのタンパク質を加えたところ、ネオエキヌリン A とタンパク質の相互作用による振動数の減少が観察された。ネオエキヌリン A の chromogranin B、glutaredoxin 3 に対する解離定数はそれぞれ 18 nM、11 nM と算出され、二つのタンパク質と高い親和性をもつことが明らかになった。また、神経細胞に分化した PC12 の chromogranin B と glutaredoxin 3 を siRNA によりノックダウンし、SIN-1 に対する感受性の変化を調べた。その結果、chromogranin B をノックダウンすることで SIN-1 に対する感受性が下がり、glutaredoxin 3 をノックダウンすることで SIN-1 に対する感受性が上がった。以上の結果から、ネオエキヌリン A は chromogranin B に結合することでその機能を阻害し、SIN-1 による細胞死を抑制している可能性が示唆された。

neuroprotective agent, phage display, target identification

発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3A14p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A14 会場

代謝産物ベタインのアナログによる構造依存的な金ナノ粒子の凍結凝集抑制効果

Structural effect of synthetic betaine-type metabolite analogs on the anti-freeze aggregation of gold nanoparticles

○山本 真史、中川 雄市、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Masafumi YAMAMOTO, Yuichi NAKAGAWA, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ.)

[研究背景]
金属ナノ粒子は、その特徴的な光学特性から細胞生物学や医療診断など、様々な分野に利用されている。しかし、コロイド粒子溶液は化学的、物理的要因によって凝集し、その光学特性を失いやすく、不安定とされる。このような粒子を安定に保存する方法としては、冷蔵・冷凍法、凍結乾燥法などがあるが、金属ナノ粒子は凍結すると、不可逆的に凝集する性質があり、冷凍保存や凍結乾燥による安定保存法の開発はほとんど検討されてこなかった。我々の研究室では、自然界の代謝産物の機能を模倣した抗凍結効果の高いベタイン型添加剤を開発しており、金属ナノ粒子の冷凍保存、凍結凝集抑制に効果を発揮することが期待される。本発表では、金属ナノ粒子として金ナノ粒子を用い、ベタイン型添加剤が金ナノ粒子の凍結凝集抑制にどのような効果を与えるか、検討を行ったので報告する。
[実験方法]
金ナノ粒子水溶液は、Sigma-aldrich 社から購入したクエン酸コートされた金ナノ粒子溶液（粒子径 10 nm）を購入して使用し、蒸留水、ベタイン型添加剤溶液、もしくはトレハロースなどの既存の凍結保護剤溶液で 2 倍に希釈した溶液をサンプル溶液として用いた。すべてのサンプル溶液は、液体窒素で 30 秒間の凍結、25℃での解凍を 20 回繰り返した。凍結凝集抑制効果は、UV-vis 分光法によって行い、金ナノ粒子のプラズモン吸収波長（λ_{max}）の変化から評価した。
[実験結果]
コントロールの蒸留水では、λ_{max} は凍結による凝集に伴って 71 nm 長波長側にシフトしたが、ベタイン型添加剤を添加すると、変化は確認されなかった。つまり、ベタイン型添加剤には金ナノ粒子の凍結凝集抑制効果があることが示された。また、その凍結凝集抑制に関わる添加濃度は、ベタイン型添加剤の構造に依存し、アンモニウムカチオンに結合するアルキル鎖長が伸長するにつれ低濃度で効果があった。凍結保護剤として知られるトレハロースと比較すると、凍結凝集抑制に関わる最小添加濃度がトレハロースで 100 mM であったのに対して、ベタイン型添加剤は 20 mM であり、トレハロースのわずか 1/5 程度の添加量で、凍結凝集抑制効果を示す優れた凍結凝集抑制として機能することが示された。講演では、これら一連の結果と共に、想定されるメカニズムについても報告する予定である。

Bataines, gold nanoparticles, anti-freeze aggregation

発表責任者：山本　真史（m1761009@s.konan-u.ac.jp）

講演番号：3A14p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A14 会場

環状ペプチド PF1171F の生体内環境における立体配座の NMR による解析
Conformational analysis of PF1171F in body's internal environment using NMR

○増田 裕一[1]、佐野 萌佳[1]、本田 将也[1]、赤木 謙一[2] ([1]三重大生物資源、[2]医薬基盤健康栄養研)
○Yuichi MASUDA[1], Moeka SANO[1], Masaya HONDA[1], Ken-ichi AKAGI[2] ([1]Mie Univ., [2]NIBIOHN)

【背景と目的】PF1171F（図 A）は子嚢菌 OK-128 株により生産される環状ペプチドであり、カイコに対して経口投与で麻痺活性を示す。X 線結晶構造解析および NMR 解析の結果、PF1171F は有機溶媒中で 4 本の分子内水素結合（図 B）を形成しており、これらが活性立体配座の形成において重要であることが示唆された [Masuda, Y. *et al. J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 11447]。しかしながら、PF1171F が実際に活性を発現する環境、つまり水系溶媒やカイコ血リンパ液における立体配座は、溶解度が非常に低いために解明されていない。本研究では、PF1171F の分子内水素結合の形成に関わっている D-Ala、D-*allo*-Ile、L-Phe、アントラニル酸（Ant）のアミド窒素を ^{15}N 標識し、リン酸緩衝液やカイコ血液中におけるアミドプロトンの様子を NMR により解析した。

【方法と結果】^{15}N 標識された D-Ala と D-*allo*-Ile は市販されていないため合成した（図 C)。トリフラート **2** に対して ^{15}N 標識したベンジルアミンを S_N2 反応により導入し、得られた **3** の保護基を変換することで、^{15}N 標識した Fmoc-D-Ala と Fmoc-D-*allo*-Ile (**4**)を得た。^{15}N 標識体を含む 6 つの Fmoc アミノ酸を固相法で伸長した後、液相で環化反応を行うことで、^{15}N 標識した PF1171F（**1**）を合成した。**1** を 100 μM の濃度でリン酸緩衝液に溶解し、^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行った。その結果、主に 2 組の化学シフトが観測され、PF1171F のリン酸緩衝液中の主要な立体配座が 2 種類あることが明らかとなった。一方、**1** をカイコ血液に溶解して同様の測定を行ったが、^{1}H-^{15}N 相関ピークは観測されなかった。その原因の一つとして、PF1171F が血液中の何らかの巨大分子に結合しているため、NMR シグナルの緩和が極めて速くなっていることが考えられた。

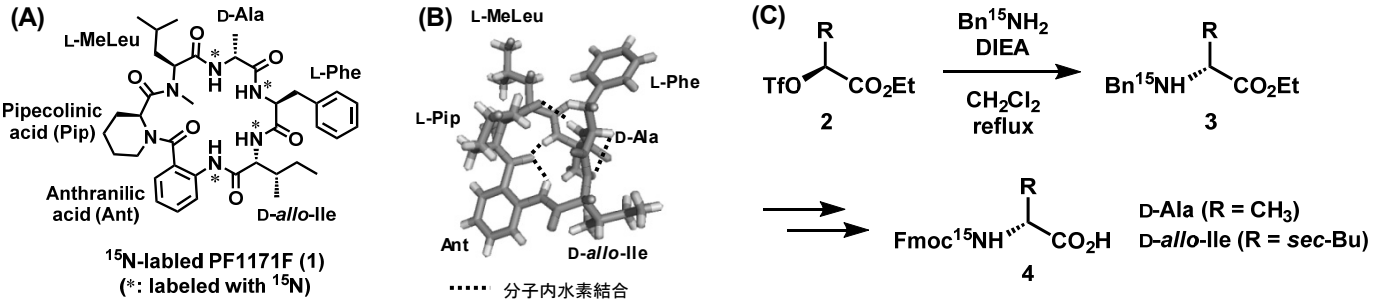


図 (A) PF1171 Fの化学構造. (B) PF1171F の結晶構造. (C) ^{15}N標識したFmoc アミノ酸の合成.

cyclic peptide, NMR, conformational analysis

発表責任者：増田　裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A14p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A14 会場

ホタル発光基質と哺乳類内在性酵素による発光現象の解明

Evaluation of bioluminescence involving firefly luciferin and mammalian enzymes

○齊藤 亮平[1,2]、仲村 厚志[1,2]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1,2] ([1]電気通信大学　大学院情報理工学研究科　基盤理工学専攻、[2]電気通信大学　脳科学ライフサポートセンター)
○Ryohei SAITO[1,2], Atsushi Nakamura[1,2], Takashi Hirano[1], Shojiro Maki[1,2] ([1]The University of Electro-Communications, [2]The University of Electro-Communications BLSC)

当研究グループでは、これまでに *in vivo* 光イメージングに有用な発光試薬の開発を行ってきた。この発光試薬はホタル生物発光のルシフェリン(基質)-ルシフェラーゼ(酵素)反応を基盤に、合成したルシフェリンアナログであり、市販材料としては世界最長波長である 675 nm で発光し『アカルミネ®』として和光純薬工業から販売されている。この後継材料として、すでに SIGMA-ARDRICH から『TokeOni』も販売している。これらの発光材料を用いることで、これまでのホタル発光波長では課題だった肺や脳などの深部組織の可視化に成功し、より高精度な測定を実現している[1,2]。

通常、モデルマウスに酵素ルシフェラーゼを遺伝子導入しているので、このルシフェラーゼと基質ルシフェリンがマウス体内で基質酵素反応し発光する。そのため、ルシフェラーゼが発現していない野生型マウスにルシフェリンを投与しても発光は観察できない。しかし、当研究室が開発した『アカルミネ®』及び『TokeOni』 は、野生型マウスに投与すると肝臓でのみ発光が確認された。

これは『昆虫由来の人工基質と哺乳類由来の天然酵素による新規発光現象』であり、今回はこの肝臓由来の発光酵素の特定に向けた活性調査とその特性評価について報告する。

bioluminescence, luciferin analogue

講演番号：3A14p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A14 会場

Ginkgolic acid, a Natural Sphingomyelin Synthase Inhibitor Inspiring "Sphingo-mimic"

○Mahadeva Swamy MAKANAHALLI MADEGOWDA[1], Yuta MURAI[2], Yusuke OHNO[3], Yoshiko SUGA[2], Masaki ANETAI[2], Jian YU[2], Min YAO[2], Akio KIHARA[3], Kenji MONDE[2] ([1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, [2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

Sphingomyelin synthase (SMS) is an enzyme to biosynthesize sphingomyelin that regulates membrane fluidity and microdomain structure. SMS2, one of the three isoforms of SMS, plays crucial roles in mediating metabolic syndrome, Alzheimer's disease and tumorigenesis, thus SMS2 could serve as a promising therapeutic target for these diseases. To understand the SMS biology under these circumstances, we have identified ginkgolic acid (GA, 15:1) as a first natural and potent inhibitor of SMS by screening library of medicinal plants and more deeply understand structure-activity relationship (SAR) study of GA. Interestingly, GA structure resembles sphingosine, so we have proved GA behaves like sphingosine by chemical methods to obtain potent and selective SMS2 inhibitors. More importantly, the "sphingo-mimic" nature of GA was confirmed by modulating sphingosine 1-phosphate receptor 1 ($S1P_1$) through the induction of ERK phosphorylation and internalization of $S1P_1$ by sphingosine 1-phosphate (S1P) mimic phospho-GA. The "sphingo-mimic" nature of GA was further confirmed by *in silico* docking-model of phospho-GA to $S1P_1$, which adopts similar binding pose to the bound ligand ML5. Collectively, GA is the first natural SMS inhibitor which inspires "sphingo-mimic".

Sphinosine, Sphingomyelin, Small molecule inhibitor

発表責任者：Mahadeva Swamy M.M（mswamy.madegowda@gmail.com）

講演番号：3A14p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A14 会場

新規リモノイドによる生活習慣病改善効果の検討

Improvement of lifestyle-related diseases by a novel limonoid

○松本 ちひろ[1]、馬場 靜[1]、田中 麗子[2]、藤森 功[1] ([1]大阪薬大・病態生化学、[2]大阪薬大・医薬品科学)
○ Chihiro MATSUMOTO[1], Shizuka BABA[1], Reiko TANAKA[2], Ko FUJIMORI[1] ([1]Lab. Pathobiochem., Osaka Univ. Pharm. Sci, [2]Lab. Med. Chem., Osaka Univ. Pharm. Sci)

【背景・目的】肥満は糖尿病や動脈硬化など多くの生活習慣病発症の危険因子とされ、その予防や解消は重要な課題である。近年、世界の肥満人口は増加傾向にあり、肥満を制御する薬剤やサプリメントの開発とともに、天然物由来成分による肥満抑制効果についても注目されている。本研究では、ブラジルのアマゾンに自生する樹木であるアンディローバ（*Carapa guianensis, Meliaceae*）の種子に豊富に含まれるリモノイドである CG-1 を抽出、精製し、肥満をはじめとする生活習慣病への影響とその作用機序について解析した。

【方法】マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞を、CG-1 を添加した培地で 6 日間培養して細胞障害性を調べた。CG-1 存在下で 6 日間脂肪細胞へと分化させ、細胞内トリグリセリドレベルを測定するとともに、脂肪細胞の分化関連の遺伝子およびタンパクの発現レベルの変化をリアルタイム PCR および Western blot 解析により調べた。さらに、CG-1 による脂肪細胞分化調節の分子機構について解析した。

C57BL/6J マウス（オス、5 週齢）を高脂肪食（60 kcal% fat）にて飼育し、CG-1（20 mg/kg）を隔日で経口投与した。体重の経時変化を調べるとともに、血液生化学検査および脂肪組織における遺伝子発現変化を調べ、CG-1 の肥満ならびに糖尿病に対する影響について解析した。

【結果・考察】3T3-L1 細胞において、CG-1 は 10 μM までは細胞障害性は認められなかった。CG-1 存在下で 6 日間脂肪細胞へ分化誘導させたところ、細胞内トリグリセリドレベルは CG-1 の濃度依存的に減少したが、トリグリセリドの分解産物であるグリセロールの遊離量は変化しなかったため、CG-1 は脂肪分解には関与しないと考えられた。また、脂肪細胞分化マーカー、脂肪酸合成系および脂肪分解系の酵素の遺伝子の発現レベルは、いずれも CG-1 により有意に低下した。Western blot 解析の結果より、CG-1 は Akt および FOXO 1 のリン酸化を抑制したことから、CG-1 は FOXO-1 のリン酸化の抑制により PPARγ 遺伝子の発現を抑制していると考えられた。

高脂肪食摂餌させたマウスに CG-1 を経口投与したところ、体重変化への影響は認められず、血中トリグリセリド量も変化しなかった。しかし、CG-1 投与により、血糖値は低下し、血中遊離脂肪酸は増加していた。以上のことから、脂肪組織において CG-1 は血糖値を低下させる作用があることが示唆され、現在、作用機構について解析を進めている。

Adipocyte, Lifestyle-related diseases, Limonoid

講演番号：3A15a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A15 会場

様々な生物種の生育を抑制するジテルペノイド化合物モミラクトンの作用機序解析
Growth-Inhibitory Action of Diterpenoid Momilactones

○富田 啓介[1]、松尾 安浩[2]、川向 誠[2]、八代田 陽子[3]、吉田 稔[3,4]、三橋 渉[5]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]島根大・生物資源、[3]理研・環境資源、[4]東大・農生科・応生化、[5]山形大・農)
○Keisuke TOMITA[1], Yasuhiro MATSUO[2], Makoto KAWAMUKAI[2], Yoko YASHIRODA[3], Minoru YOSHIDA[3,4], Wataru MITSUHASHI[5], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shimane Univ., [3]RIKEN CSRS, [4]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [5]Yamagata Univ.)

【背景・目的】モミラクトンは栽培イネ *Oryza sativa* や数種の野生イネ、水田雑草イヌビエ *Echinochloa crus-galli*, 及び蘚類ハイゴケ *Hypnum plumaeforme* により生産されるアレロパシー物質であり、モミラクトン A とモミラクトン B が知られている。モミラクトンは他の植物の生育を阻害するだけでなく、抗菌活性を併せ持つことから、モミラクトン生産植物は他の植物との生存競争や病原菌の感染防御にこの生理活性物質を利用していると考えられる。更に近年、モミラクトン B が抗腫瘍活性を持つことが報告され、モミラクトンが幅広い生物種に対する作用スペクトルを持つことが示唆されている。しかしながら、モミラクトンが様々な生物種の生育を阻害する作用機序は未解明であり、本研究はモミラクトンの作用機序の解明を目的としている。前年度本大会において、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* がモミラクトンに対し高い感受性を示し、モミラクトン添加培地中で培養した分裂酵母は細胞の伸長やマルチセプタムの形成等、細胞周期進行の阻害が原因と考えられる形態変化を示すことを報告した。本年度は、分裂酵母 ORF 過剰発現株ライブラリーからのモミラクトン耐性株のスクリーニングにより、モミラクトンのターゲット分子の探索を試みた。また、モミラクトンの植物培養細胞における細胞周期に対する影響についても検討した。
【方法・結果】多剤薬剤耐性に関わる ABC トランスポーターをコードする遺伝子 *pmd1* 及び *bfr1* 破壊株をバックグラウンドとした薬剤感受性の分裂酵母 ORF 過剰発現株ライブラリーから、1 μM のモミラクトン B に対し耐性を示す株をスクリーニングした。得られた耐性株において過剰発現している遺伝子の解析を進めた結果、トランスポーターをコードする *pmd1* と *caf5* が得られた。これらはモミラクトンの直接のターゲットではなく、モミラクトンを細胞外に排出することにより酵母に耐性を付与していると考えられる。モミラクトンは分裂酵母に対して細胞周期阻害に起因すると考えられる形態変化を誘導することから、植物細胞におけるモミラクトンの作用について、ニンジン培養細胞を用いて細胞周期に対する影響を検討した。各細胞周期マーカー遺伝子の転写量を qRT-PCR により定量したところ、特定の細胞周期でのアレストは確認されず、植物と分裂酵母ではモミラクトンの作用点が異なっている可能性が示唆された。現在、分裂酵母のモミラクトン感受性を抑圧する遺伝子候補の解析を継続しており、また、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーおよび EMS 変異プールを用いてモミラクトン感受性が変化した株のスクリーニングも進めている。

terpenoid, fission yeast, phytoalexin

発表責任者：富田啓介（uktomita@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A15a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A15 会場

イネが生産する（*R*)-β-tyrosine のシロイヌナズナにおける根の生育阻害活性

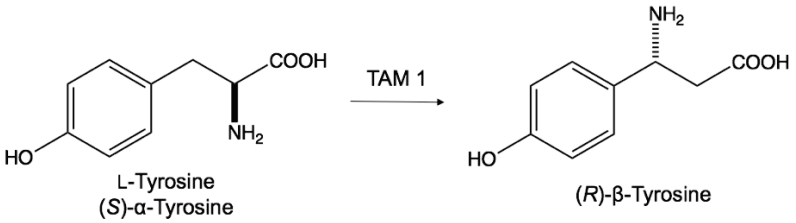
Root growth inhibitory activity of (*R*)-β-tyrosine produced by rice in Arabidopsis thaliana

○中道 雅貴、中田 隆、吉永 直子、小林 優、寺石 政義、奥本 裕、森 直樹（京大農）
○Masaki NAKAMICHI, Ryu NAKATA, Naoko YOSHINAGA, Masaru KOBAYASHI, Masayoshi TERAISHI, Yutaka OKUMOTO, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】

イネ (日本晴) は tyrosine aminomutase 1 (TAM1) により L-tyrosine から (*R*)-β-tyrosine を生合成する [1]. また，(*R*)-β-tyrosine がシロイヌナズナの根の伸長を抑えることを明らかにした.

本研究では，α-tyrosine，β-tyrosine，α-phenylalanine，β-phenylalanine の R-体，および S-体を用い，根の伸長阻害活性を比較した.



【方法・結果】

<u>生物試験法の確立</u>

1/2 MS 培地をシャーレに調製し，滅菌したシロイヌナズナ種子を各 10 粒播種後，4℃で 4 日間静置した. インキュベーター (16 h/light /26℃, 8 h/dark/18℃) で 3 日間生育させた後，供試化合物を添加した 1/2 MS 培地に移植し，4 日間生育させた. 4 日後のシロイヌナズナの根の長さを画像解析ソフト ImageJ で測定し、根の伸長阻害活性を比較した.

<u>Tyrosine・phenylalanine の異性体による根の伸長阻害活性</u>

上記 4 化合物の各光学異性体を用いた生物試験では，(*R*)-β-tyrosine と (*S*)-β-tyrosine が根の伸長を阻害した. その結果，活性発現には芳香環の *p* 位の水酸基と β 位のアミノ基が重要と示唆された. 今後は，(*R*)-β-tyrosine がシロイヌナズナ体内でどのように代謝されるかを検討する.

【参考文献】

1) Jian Yan et al. (2015) The Tyrosine Aminomutase TAM1 Is Required for b-Tyrosine Biosynthesis in Rice The Plant Cell, Vol. 27: 1265–1278

arabidopsis thaliana, β-tyrosine, inhibitory activity

発表責任者：中道雅貴（nakamichi.masaki.68s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A15 会場

アミロイドβとカフェ酸エステル誘導体型凝集阻害剤の核磁気共鳴法による相互作用解析

Interaction analysis for amyloid ß aggregation inhibition by caffeic acid derivatives with NMR spectroscopy

○杉浦 亜美[1]、馬渡 康輝[2]、田口 莉帆[2]、関 千草[2]、中野 博人[2]、徳樂 清孝[2]、上井 幸司[2]([1]室工大、[2]室工大院工)
○Ami SUGIURA[1], Yasuteru MAWATARI[2], Riho TAGUCHI[2], Chigusa SEKI[2], Hiroto NAKANO[2], Kiyotaka TOKURAKU[2], Koji UWAI[2] ([1]Muroran Inst. Tech., [2]Grad. Sch. Eng. Muroran. Inst. Tech.)

【目的】アルツハイマー病 (AD) の原因物質と考えられているアミロイド β (Aβ) はオリゴマー化により神経細胞毒性を示し，AD 発症へと導く[1]. そのため，Aβ オリゴマー形成阻害機構の解析は AD 予防または治療薬の開発へ繋がると期待される. 最近, 当研究室で実施されたシソ科ハーブに多く含まれるロスマリン酸およびその誘導体カフェ酸エステルを用いた Aβ 凝集阻害機構の解析[2]は, それぞれの物質の凝集阻害段階が複数存在する可能性を示唆している. そこで, 本研究ではタンパク質と相互作用するリガンドのシグナルのみ観測可能な NMR 法の一つである飽和移動差スペクトル (STD) 法により, ロスマリン酸およびカフェ酸 C5 エステルと Aβ との相互作用を検討した.
【方法】ロスマリン酸およびカフェ酸 C5 エステルの Aβ 凝集能への影響をチオフラビン T (ThT) 法により検討し，NMR 測定条件を確定後，Aβ と阻害剤の相互作用を STD 法により検討した.
【結果及び考察】ロスマリン酸と Aβ の共存溶液の STD-NMR スペクトルを飽和時間を変化させながら測定した結果, 芳香族領域のみシグナルが観測され, 飽和時間短縮に伴いシグナルの強度は低下した. 従ってロスマリン酸は Aβ と芳香族の部位で相互作用をしていることが示唆された. これに対して, カフェ酸 C5 エステルと Aβ の共存溶液では芳香族およびアルキル鎖のシグナルが観測され, これらの部位で相互作用をしていることが示唆された.より詳細に相互作用を検討するために STD 法の測定結果をもとに相互作用強度を計算により求めたところ, ロスマリン酸はビニルプロトンよりも芳香族プロトンの方が相互作用の強度が大きく, カフェ酸 C5 エステルではベンジル位のビニルプロトンが最も相互作用の強度が大きいことが示唆された. この結果は Aβ モノマーとこれら阻害剤とのドッキング計算結果とも一致した.

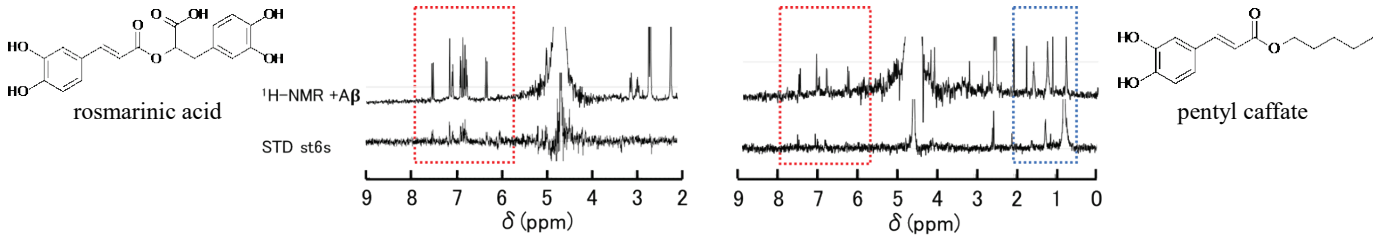


Figure STD-NMR spectra of the mixture containing Aβ and rosmarinic acid or pentyl caffate

[文献] 1) C. R. Jack Jr *et al.*, *Lancet Neurol.*, **12**, 207-216, (2013).
2) R. Taguchi *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **138**, 1066-1075, (2017).

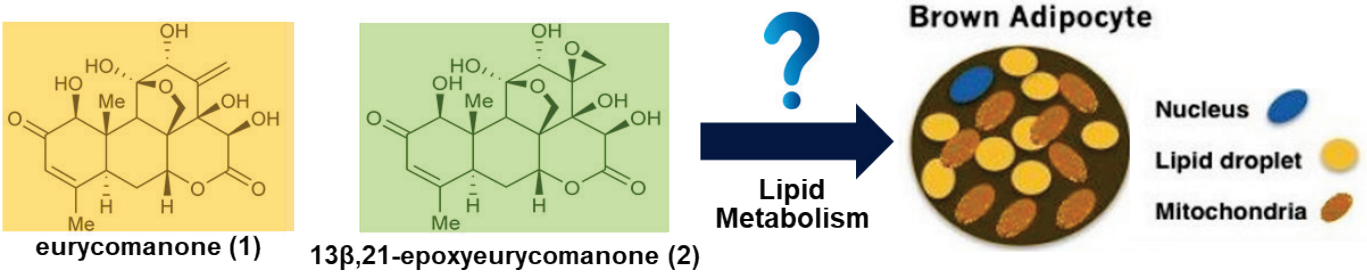
amyloid ß, rosmarinic acid derivatives, STD-NMR spectroscopy

講演番号：3A15a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A15 会場

Activity of Eurycomanone and Epoxy-eurycomanone on Lipid Metabolism in WT-1 Brown Adipocytes

○Lucy LAHRITA[1], Eisuke KATO[1], Yu-Hua TSENG[2], Jun KAWABATA[1] ([1]Hokkaido University, Japan, [2]Joslin Diabetes Center, USA)

Background: Obesity has become one of the most significant risk factors for various metabolic diseases. Thus, research regarding the treatment of obesity and its related diseases using energy-consuming cells (brown adipocytes) has steadily grown in popularity.
Aim of study: Our previous study found that eurycomanone (1) and epoxy-eurycomanone (2) have the ability to enhance lipolysis in 3T3-L1 mouse white adipocytes, indicating potential anti-obesity agents. However, the activity of these novel compounds on lipid metabolism in brown adipocytes is still unknown. Therefore, this study aimed to investigate lipid-accumulation suppressing and lipolytic activities of the two compounds (1) and (2) in WT-1 mouse brown adipocytes.
Materials and methods: The differentiated WT-1 brown adipocytes were serum-starved and treated with (1) and (2) for 2 days. The supernatants were collected, and the amount of glycerol released into the medium was measured. Lipid accumulation in the adipocytes was dyed using AdipoRed Nile Red staining.
Results: Compounds (1) and (2) suppressed lipid accumulation and increased glycerol release of WT-1 brown adipocytes in a concentration-dependent manner, representing an increase of triglyceride breakdown. Compound (2), the epoxy-derivative, exerted stronger activities than compound (1).



Brown adipocytes, Eurycomanone, Lipid

講演番号：3A15a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A15 会場

X 線照射下でのケルセチン修飾体の ROS 発生能評価およびがん細胞への影響評価
Evaluation of ROS generation by quercetin derivatives under X-ray irradiation and of effects on cancer cells with X-ray irradiation

○倉田 佳苗[1]、外山 実千留[2]、森 崇[1]、山内 恒生[1]、光永 徹[1]、岩橋 均[1]、高橋 淳子[3]([1]岐阜大学応生、[2]朝日大学口腔研、[3]産総研)
○ Kanae KURATA[1], Michiru TOYAMA[2], Takashi MORI[1], Kosei YAMAUCHI[1], Tohru MITSUNAGA[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Junko TAKAHASHI[3] ([1]Gifu Univ., [2]Asahi Univ., [3]AIST)

【背景・目的】がんの新たな治療法として、ヘムの前駆体であるポルフィリンを用いた放射線力学療法が臨床試験を開始する段階に入っている。ポルフィリンはがん細胞に特異的に蓄積し、X 線の照射により活性酸素種（ROS）を発生させ、細胞障害を引き起こす。このような有機化合物が増感剤として利用可能であることを受け､我々は新たなROS発生型X線増感剤となる物質の探索を行っている。これまで、生体に対し毒性が低いとされる有機化合物のライブラリーより探索を行い、フラボノイドの一種であるルテオリンが最も高い ROS 発生能を示した。さらに、フラボノイドに注目して検討を行ったところ、ケルセチンが最も高い ROS 発生能を示した。そこで、本研究では、ケルセチンが持つ各ヒドロキシ基の ROS 発生に対する重要性を明らかにするため、ケルセチンのヒドロキシ基を置換した修飾体を用いて ROS 生成能を評価した。さらに、X 線照射下で、ケルセチンのがん細胞への影響を評価した。

【方法・結果】ケルセチンのヒドロキシ基の一部をメチル基やアセチル基などに置換した修飾体 10 種類と、ジヒドロエチジウムの混合物に X 線を照射し、その後、速やかにマイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。ジヒドロエチジウムは ROS 検出のための蛍光プローブである。この結果、ケルセチンの ROS 発生には 3、4'位のヒドロキシ基が重要であること、7 位のヒドロキシ基はあまり重要ではないことが示唆された。これは、ケルセチンの ROS 発生では、ケルセチンの 2、3 位の二重結合と、3 位のヒドロキシ基が特に重要で、ヒドロキシ基が 3 つまたは 4 つ必要であるというこれまでの結果に矛盾しない。またこの結果、無修飾のケルセチンを上回る ROS 発生能をもつものは見られなかった。続いて、ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞（A549）を用いて細胞への影響評価を行った。細胞障害性、細胞増殖能力への影響を見るために、Cell Counting Kit-8 と CFU を用いて評価した。この結果、X 線を照射せずケルセチンの暴露のみでも細胞障害、増殖障害が見られること、X 線照射を行うとより強い細胞障害、増殖障害が見られることが示唆された。

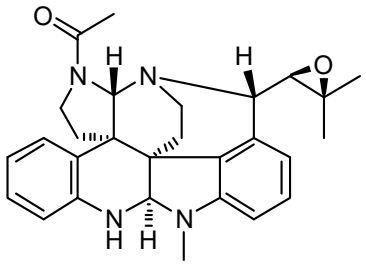
Quercetin, Reactive Oxygen Species (ROS), Cancer cell

講演番号：3A15a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A15 会場

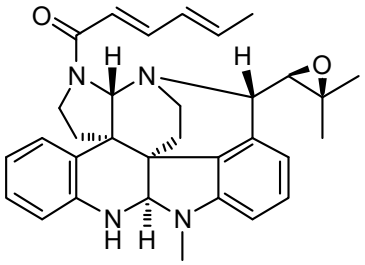
昆虫グルタミン酸作動性塩素チャネルの多様性とインドールアルカロイドコムネシンの活性化作用
Diversity of insect glutamate-gated chloride channels and activating action of indole alkaloids communesins

○野口 晃[1]、橋本 杏樹[1]、古谷 章悟[3]、奥原 大樹[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院・農、[2]阪府大農・生環科、[3]理研)
○Akira NOGUCHI[1], Anjyu HASHIMOTO[1], Shogo FURUTANI[3], Daiki OKUHARA[1], Makoto IHARA[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kindai Univ., [2]Sch. Life Env. Sci., Osaka pref Univ., [3]Riken)

［目的］コムネシン類は *Penicillium expansum* 等の糸状菌が生産するインドールアルカロイドであり、カイコガ幼虫に対して殺虫活性を示す[1]。我々はこれまでにコムネシンの殺虫活性の原因を研究し、本化合物群がカイコガのグルタミン酸作動性塩素チャネル（GluCl）を活性化することを示したが、GluCl のどこにそれらが結合するのか、また当該活性が昆虫普遍的かどうかについては不明である。本研究では exon 3 での選択的スプライシングによる GluCl の構造変化[2]がコムネシンの活性に影響するのか、また他の昆虫腫の GluCl に対してコムネシンが活性化作用を示すのか検討したので報告する。
［方法］コムネシン A と B は *P. expansum* MK-57 株を培養したオカラ培地から精製した。カイコガ[1]とショウジョウバエの GluCl の cDNA はそれぞれの昆虫種からクローニングした。両昆虫種の GluCl は cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることで発現させ、その応答を二電極膜電位固定法で測定した。
［結果と考察］カイコガ GluCl に対してコムネシン A と B を試験したところ、いずれのバリアントに対してもコムネシン B はコムネシン A より高い活性を示したが、両化合物の濃度―GluCl 活性化関係はバリアント間で変わらなかったことから、exon 3 コード領域はコムネシン類の結合には関与しないと考えられた。ショウジョウバエ GluCl に対してもコムネシン A と B を試験したところ、両化合物ともカイコガ GluCl と同様な濃度で本受容体を活性化したことから、コムネシンの活性スペクトラムは広いと推察された。



Communesin A



Communesin B

[1]Hayashi, H. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 753-756 (2003).
[2]Furutani S. *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 86, 686-695 (2014).

Communesin, Glutamate-gated chloride channel, Indole alkaloid

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

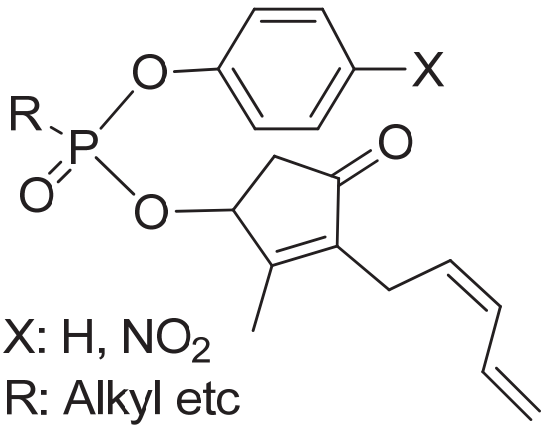
講演番号：3A15a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A15 会場

ピレスリン生合成酵素 TcGLIP に対する有機リン酸エステル型阻害剤の活性評価
Evaluating inhibitory activity of phosphonate compounds on TcGLIP involved in pyrethrin biosynthesis

○髙松 元紀[1]、伊原 誠[1]、松尾 憲忠[2]、松田 一彦[1]（[1]近畿大院・農、[2]関学・理）
○Genki Takamatsu[1], Makoto Ihara[1], Noritada Matsuo[2], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kindai Univ., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

［目的］除虫菊（*Tanacetum cinerariifolium*）は昆虫抵抗因子として神経毒ピレスリンを合成し、子房や葉に蓄積する。ピレスリンはエステル化合物であり、酸部およびアルコール部としてそれぞれ菊酸（第一菊酸と第二菊酸）とレスロロン（ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロロン）が別々の経路で生合成され、最後にアシル基転移反応によって当該エステル結合が形成される。我々はこれまでに、このエステル結合形成反応を触媒する GDSL リパーゼを同定し TcGLIP と命名した[1]。本酵素はピレスリン生合成の最終ステップに位置することからピレスリン総合成量や 6 種のピレスリン類の組成のみならず、生合成関連遺伝子の発現も支配すると推察される。本研究ではこの仮説を検証するため、TcGLIP の阻害剤を合成し、阻害活性を評価したので報告する。
［方法］TcGLIP はマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アミロースレジンで粗精製したのち、陰イオン交換カラムで精製した。その均一性は SDS-PAGE とゲル濾過で確認した。本酵素の活性は、菊酸 CoA とピレスロロン類から生じるピレスリン類を HPLC で定量することで求めた。TcGLIP は加水分解系酵素であり、活性中心のセリンは有機リン酸エステルによって不可逆的に阻害すされることを念頭に、下記の阻害剤を合成した。すなわち脱離基としてフェニルあるいは *p*-ニトロフェニル基を採用し、その他の位置にアルキル基とピレスロロンを導入した。

TcGLIP を阻害剤とともに一定時間インキュベート後、基質を加えることで生じるピレスリンの生成量を対照区のピレスリン生成量と比較することで化合物の阻害活性を評価した。その結果、フェニルエステル類は微弱な阻害活性しか示さないのに対して *p*-ニトロフェニルエステル構造をもつ阻害剤はいずれも顕著な阻害活性を示した。ピレスロロンと *p*-ニトロフェニルエステル構造をもつ右図の阻害剤のアルキル基（R）の長さを炭素数 6 から 8 まで変化させ、それらの TcGLIP 阻害活性を測定したところ、いずれの化合物も 1 nM で TcGLIP を阻害し、立体異性体間で阻害活性に差が認められた。



[1]Kikuta Y. *et al.*, *Plant J.* 71, 183-193 (2012).

GDSL lipase, pyrethrin biosynthesis, rethrolone

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A15a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A15 会場

Easy isolation of pure betanin from red beetroots as substrate for an effective imine-exchange reaction to obtain several betalamic acid-aldimine derivatives

○Jie DUAN, Junichi ASANO, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

【Background】 Betalains are nitrogen-containing plant pigments distributed throughout order Caryophyllales and in some fungal genera. The main structural characteristic of betalains is the presence of an aldimine bond (-N=CH-) between formyl group of betalamic acid and amino group of amino acids. In the red pigment betanin, imine bond formation between betalamic acid and the secondary amine of 5-*O*-glycosyl-*cyclo*-DOPA forms a red to violet pigment betanin while bond formation with the amino group of varying alpha−amino acids yields yellow colored betaxanthins. The pigments have a remarkable permeability to pass through the cell membrane and work effectively not only as antioxidant agents but also some functional substances.

【Methods, results, and discussion】 Red beetroots (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, cv. Detroit Dark Red) harvested at Eniwa, Hokkaido, in September 2016 (approximately 2 kg f.w.) were crushed and squeezed in 0.05% citric acid (w/v, pH 3.0), and the juice deproteinated with 70%-saturated ammonium sulfate was passed through a Cosmosil 75C_{18}-PREP (1.5 L) on a Büchner funnel. The betanin-capturing carrier bed was washed with 0.3% aq. citric acid solution followed by 1% EtOH-containing 0.3% aq. citric acid solution. The resulting carrier particles that had trapped betanin pigment were recovered with 10% EtOH-containing 0.3% aq. citric acid solution. Condensed betanin-citric acid mixture (20-50 mM, 1:2-5 molar equivalent) was co-precipitated and the blackish amorphous was finally washed with acetone to obtain fine betanin powders (0.5 g from 1 kg red beetroots). This pure betanin was subjected to imine-exchange reactions to yield betacyanin with indoline and betaxanthins with spermidine, and anisomycin. The aldimine exchange reaction was done in EtOH at 40-60°C to precipitate 5-*O*-glycosyl-*cyclo*-DOPA released. The products purified by Cosmosil 75C_{18}-OPN carriers were confirmed its structure by TOF-MS and ^{1}H-NMR. The betalamic acid derivatives were more permeable into cells than single amines due to the high cell membrane permeability of betalamic acid moiety, which indicated the possibility of the betalamic acid-aldimine derivatives as selective drug delivery molecules into tumor cells. Investigation of the effectiveness and *in vitro* cytotoxicity of the novel betaxanthins on human cells is now in progress.

betanin preparation, betalamic acid-aldimine derivatives, imine-exchange reaction

講演番号：3A15a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A15 会場

YM-53601 によるスクアレン合成酵素の光分解機構の解析
Photo-degradation of squalene synthase by YM-53601
○竹本 靖[1]、マオ ディ[1]、ゴツェ セバスチャン[1]、上杉 志成[1,2] ([1]京大化研、[2]京大 iCeMS)
○Yasushi TAKEMOTO[1], Di MAO[1], Sebastian GOTZE[1], Motonari UESUGI[1,2] ([1]ICR, Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

（目的）スクアレン合成酵素（SQS）は、ファルネシル二リン酸からスクアレンを合成する酵素であり、生体内でのコレステロール合成に必須である。そのため、コレステロールの生合成の阻害を目的として、YM-53601 等の SQS 阻害剤が開発されてきた。興味深いことに、YM-53601 を動物細胞に添加し、紫外線を照射すると、SQS が分解されることを我々は見出した。そこで、本研究ではそのメカニズムを解析した。
（方法と結果）まず YM-53601 の SQS における結合サイトの同定を試みた。SQS 阻害剤は細胞内のコレステロールの生成を抑制することで、転写因子 SREBP の活性化を誘導する。実際に、YM-53601 やザラゴジック酸 A といった SQS 阻害剤を HeLa 細胞に添加すると、SREBP の転写活性化が認められたことから、これらの化合物が細胞内で SQS の酵素活性を阻害していることが確認された。これに対し、N 末側（1-30）及び C 末側（371-417）を欠損した SQS のリコンビナントタンパク質を用いて、その酵素活性に及ぼす影響について試験管内で検討したところ、基質に対し拮抗阻害を示すザラゴジック酸 A と異なり、YM-53601 の酵素阻害活性は著しく弱かった。これらの結果から、YM-53601 の SQS における結合サイトは N 末領域、あるいは C 末領域であることが推察された。そこで、SQS の N 末領域、あるいは C 末領域の欠損変異体を HEK293 細胞に発現させ、YM-53601 の添加と紫外線を照射した際の応答性を検討した。その結果、C 末領域を欠損した SQS の変異体では YM-53601 による光分解が生じなかったことから、YM-53601 は SQS の C 末領域に結合していることが示唆された。さらに、EGFP、あるいは EGFP に SQS の C 末領域を連結した融合タンパク質を HEK293 細胞に発現させ、YM-53601 の存在下で紫外線を照射したところ、SQS の C 末領域を融合した EGFP タンパク質のみで分解が生じた。以上の結果より、YM-53601 は SQS の C 末領域に結合し、紫外線照射に応答して SQS を分解に導くことが明らかとなった。また YM-53601 によるタンパク質の光分解には、SQS の C 末領域のみで十分であることから、この領域はタンパク質の新しい機能性タグとして活用できることが示唆された。

YM-53601, squalene synthase, photo-degradation

発表責任者：上杉　志成（uesugi@scl.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A15 会場

Antibacterial activity of a novel porphyrin derivative isolated from harmful red tide phytoplankton *Heterocapsa circularisquama*

○Wencheng LI, Tatsuya ODA (Nagasaki Univ.)

Heterocapsa circularisquama, a dinoflagellate, is one of harmful red tide phytoplankton (marine microalga), and is known to be highly toxic to bivalves. We previously found that the methanol extract prepared from this dinoflagellate contains novel porphyrin derivatives that can induce light-dependent hemolytic activity toward some mammalian red blood cells. Interestingly, we also found that one of the porphyrin derivatives (named H2-a) exhibits potent cytotoxicity on HeLa cells in a concentration and light-dependent manner, and morphological changes of HeLa cells treated with H2-a was necrotic. To further analyze the biological activity of H2-a, in this study, we investigated the antibacterial activity of H2-a on various bacteria. Following our previous studies, we prepared H2-a through methanol extraction, Sephadex LH-20, and thin-layer chromatography (TLC). Only a fraction (F-5) equivalent to H2-a obtained after Sephadex LH-20 chromatography showed antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. The activity was absolutely light-dependent, and no significant activity was observed in the dark even at quite higher concentration. To evaluate antibacterial spectrum of F-5, two Gram-positive bacterial strains (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*), two Gram-negative bacteria strains (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), and one marine bacteria strain (*Vibrio anguillarum*) were used. The result demonstrated that F-5 can kill both Gram-positive and negative bacteria in the light with different extent depending on the bacterial strains. Among the bacterial strains, Gram-positive bacteria tend to be higher sensitivity than Gram-negative bacteria. The antibacterial spectrum of F-5 was evidently different from that of 5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) porphyrin tetra(ptoluenesulfonate), a commercially available photosensitizing porphyrin compound with antibacterial activity. Using the intrinsic fluorescence of F-5, binding experiments of F-5 against *S. aureus* and *E. coli* were conducted. The results indicated that F-5 showed higher affinity to *S. aureus* than that of *E. coli*. This may partly explain the reason why *S. aureus* is more sensitive to F-5 than *E. coli*. Our results suggest that F-5 is probably the H2-a porphyrin derivative with antibacterial activity, which can be used for photodynamic antibacterial chemotherapy.

Heterocapsa circularisquama, Antibacterial activity, Porphyrin derivative

発表責任者：Tatsuya Oda（t-oda@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：3A15a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A15 会場

ショウジョウバエニコチン性アセチルコリン受容体 Dα1 サブユニットの YXCC モチーフ構造とネオニ コチノイド感受性

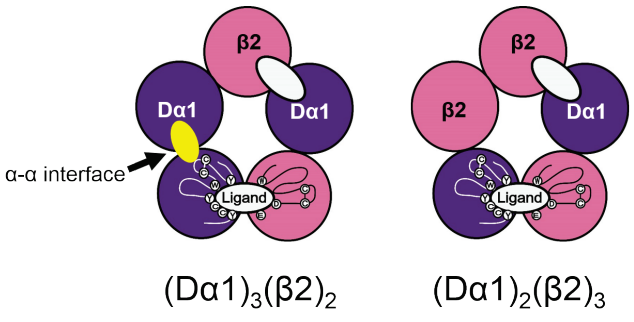
Structure of the YXCC motif of Drosophila nicotinic acetylcholine receptor Dα1 subunit and neonicotinoid sensitivity

○疋田 麻衣、奥原 大樹、伊原 誠、松田 一彦（近畿大院農）
○Mai HIKIDA, Daiki OKUHARA, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Grad. Sch. Agric., Kindai Univ.)

［目的］ネオニコチノイド系殺虫剤は昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を選択的に活性化し、それにはαサブユニットの loop B 上流のアミノ酸と loop C の YXCC モチーフが関与する。最近我々は、ショウジョウバエ Dα1 サブユニットでは loop B 上流に位置する loop D および E の塩基性アミノ酸と loop G の酸性アミノ酸つくるトライアングル構造がネオニコチノイド感受性の決定に重要な役割を果たしていることを見出している[1]。本研究はこの構造が、loop C の YSCC モチーフとどの程度の割合でネオニコチノイド感受性の決定に寄与するのか、Dα1-ヒヨコ β2 nAChR を用いて Dα1 サブユニットと β2 サブユニットの割合を変えながら解析したので報告する。

［方法］野生型および変異をもつ nAChR は注入する両サブユニットの cRNA の混合比を変えながらアフリカツメガエル卵母細胞発現させた。すなわち Dα1 サブユニットと β2 サブユニットの cRNA の混合比を 5:1 および 1:5 とすることで$(Dα1)_3(β2)_2$ および $(Dα1)_2(β2)_3$ nAChR を発現させ、それぞれの受容体に対するアセチルコリンおよびネオニコチノイドのアゴニスト活性を測定した。

［結果と考察］Dα1 サブユニットの YSCC モチーフを YECC 配列に変異させた S221E 変異体は、$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR であれ$(Dα1)_2(β2)_3$ nAChR であれ、アセチルコリンに対して野生型と同程度の感受性を示した。しかし同変異をもつ$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR は、イミダクロプリドおよびチアクロプリドに対して野生型に比べて有意に低い感受性を示した。ところが、このような現象は$(Dα1)_2(β2)_3$ nAChR では顕著に表れなかったことから、ネオニコチノイドは隣接 Dα1 サブユニットの境界のオルトステリック部位と相互作用し、S221E 変異がもたらす$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR のネオニコチノイド感受性の低下は導入したグルタミン酸残基とネオニコチノイドに特有のニトロ基あるいはシアノ基との静電的相互作用のためと推察された。これまでに、Dα1 サブユニットの loop D-E-G トライアングルの R57S; E78K; K140 変異は$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR のネオニコチノイド感受性を低下させることが明らかになっている。そこでこの 3 重変異と S221E 変異を組み合わせたところ、S221E 変異の場合よりも大きく$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR のネオニコチノイド感受性は低下した。この 4 重変異の影響は$(Dα1)_2(β2)_3$ nAChR でも見られたが、その程度は$(Dα1)_3(β2)_2$ nAChR の場合よりも小さかった。



[1]Ihara M., Hikida M. *et al*., *Br. J. Pharmacol.* (2017) in press.

nicotinic acetylcholine receptor, neonicotinoids, α-α interface

発表責任者：疋田麻衣（1733670006r@nara.kindai.ac.jp）

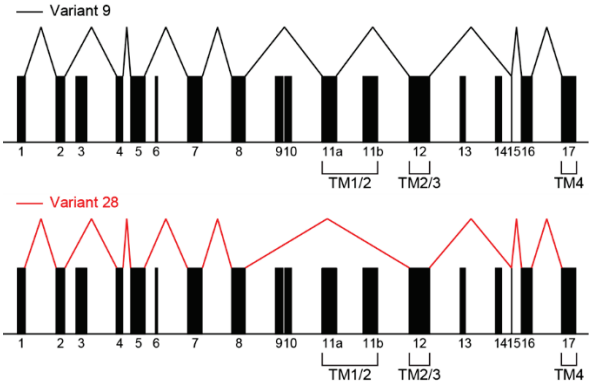
講演番号：3A15a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A15 会場

カイコガ pH 感受性塩素チャネルの膜貫通領域欠損型バリアントの機能解析

Functional analysis of *Bombyx* pH-sensitive chloride channel variants lacking a transmembrane region

○奥原 大樹、野口 晃、伊原 誠、松田 一彦（近畿大院・農）
○Daiki OKUHARA, Akira NOGUCHI, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Grad. Sch. Agri. Kindai Univ.)

［目的］昆虫等の無籍動物に特有の受容体は選択毒性に優れた農薬開発の有望なターゲットである。pH 感受性塩素チャネル（pHCl）は、昆虫および線虫の神経系でだけ発現するリガンド作動性塩素チャネルの一種で、その内在リガンドや機能はよくわかっていない。これまで我々はカイコガ幼虫の pHCl の発現様式を解析し、50 以上ものバリアントが発現していることを見出し、2 つのバリアントを比較することでイベルメクチン感受性の違いに関与する 1 つのアミノ酸を同定している [1,2]。本研究では、係る解析の中でみつかった膜貫通領域欠損型バリアントの機能を解析することを目的とした。
［方法］塩素チャネル機能をもつ pHCl バリアント 9、および膜貫通領域を欠損したバリアントの cDNA を pcDNA3.1(+)ベクターにクローニングし、それを鋳型としてそれぞれバリアントの cRNA を調製した。各バリアントは cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入することで発現させ、その機能は二電極膜電位固定法によりイオン電流として記録した。
［結果と考察］バリアント 9 と膜貫通領域を欠損したバリアント 28 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、その機能解析を行った。その結果、膜貫通領域を欠損したバリアント 28 は単独では pH 感受性の塩素チャネルを形成しなかった。しかし、バリアント 9 とバリアント 28 を共発現させると、バリアント 9 の pH 感受性、イベルメクチン感受性が促進された。我々は当初、これらのバリアントの共発現により、ドミナントネガティブ作用が起こるものと考えていた。この結果はその予想とは逆であった。しかしこのことから、単独ではイオンチャネルとしての機能を持たないバリアントが機能的なバリアントの補助因子として働く、という生体内での役割が明らかとなった。



[1]Nakatani Y., *Pestic. Biochem. Physiol.* 126:1-5 (2016); [2]Okuhara D., *Mol. Pharmacol.* 92(4):491-499 (2017).

pH-sensitive chloride channel, ivermectin, co-expression

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A15a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A15 会場

N,N-ジメチルスフィンゴシンによる神経疼痛に関わる神経伸長因子とチロシンキナーゼ A の相互作用研究

Study of the interaction between nerve growth factor and tyrosine kinase toward neuropathic pain by N,N-dimethylsphingosine

○関口 晃弘[1]、村井 勇太[2]、臼杵 靖剛[2]、門出 健次[2] ([1]北海道大学　理学部、[2]北海道大学　大学院生命科学院)
○Akihiro SEKIGUCHI[1], Yuta MURAI[2], Seigo USUKI[2], Kenji MONDE[2] ([1]Hokkaido University School of Science, [2]Faculty of Life Science, Hokkaido Univ.)

［背景と目的］

最近スフィンゴ脂質代謝経路においてスフィンゴシンから代謝される D-*erythro N,N*-ジメチルスフィンゴシン（DMS）は神経疼痛モデルマウスにおいて血中濃度が著しく増加することが報告され、また DMS をマウスに与えることによって神経疼痛を亢進することも確認された[1]。さらに、多発性硬化症患者においても血中 DMS 濃度が高くなっていることが報告され[2]、臨床データとして DMS の疼痛関与が示唆されている。神経疼痛は中枢神経または末梢神経が様々な原因による損傷・機能障害を起こすことによって起こる痛みの総称であり、主な要因として、自己免疫疾患や抗がん剤の副作用や糖尿病などの代謝障害、ヘルニアなどによる神経の圧迫が挙げられる。

一方、神経伸長因子 (NGF)は中枢神経や末梢神経の突起伸長を促し、神経の生存に必須の栄養因子であり、この NGF をヒトの皮下、咬筋、神経に投与することで、疼痛症状が発症することがすでに確認されている。これは膜貫通型タンパク質の一つチロシンキナーゼ A (trkA)に NGF が結合し、trkA が活性化（リン酸化)されることで細胞の突起伸長が促され疼痛を促すものである。従って、これらの研究結果から DMS が NGF と trkA の相互作用に何かしらの影響を及ぼすことと示唆し、本研究では DMS の NGF 及び trkA への影響を確認することとした。

［方法］

はじめに生体内に存在する D-*erythro* 体とその鏡像異性体である L-*erythro* 体 DMS (非天然)を合成した。続いて FITC で蛍光標識した NGF を用いて D-*erythro* 体及び L-*erythro* 体 DMS 有無による NGF と trkA との相互作用を蛍光強度にて確認した。

［結果］

NGF と trkA の相互作用測定では、生体中に存在する D-*erythro* 体 DMS でのみ蛍光強度の増加が確認され、L-*erythro* 体 DMS では差が確認されなかった。このことから D-*erythro* 体のみが NGF と trkA の相互作用を促進し、特に DMS の立体構造が活性に関与していることも示唆された。現在、さらなる検証のため DMS による trKA のリン酸化への影響についても検討中である。

1) Gary J. Patti, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 232. 2) Y-J. Chen, *et al.*, *Neuroscience* **2014**, *279*, 113.

N,N-dimethylsphingosine, neuropathic pain, nerve growth factor

講演番号：3A15a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A15 会場

哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムの分子機構
The molecular mechanism of a cyanobacteriochrome that can incorporate an intrinsic chromophore of mammalian cells.

○伏見 圭司[1]、宮崎 剛亜[2]、山本 達郎[1]、竹田 百花[1]、桑崎 勇人[3]、中嶋 隆浩[3]、榎本 元[3]、池内 昌彦[3]、朴 龍洙[2]、佐藤 守俊[3]、成川 礼[1] ([1]静大・理学、[2]静大・グリーン、[3]東大・総合)
○ Keiji FUSHIMI[1], Takatsugu MIYAZAKI[2], Tatsuro YAMAMOTO[1], Yuka TAKEDA[1], Yuto KUWASAKI[3], Takahiro NAKIJIMA[3], Gen ENOMOTO[3], Masahiko IKEUCHI[3], Enoch Y. PARK[2], Moritoshi SATO[3], Rei NARIKAWA[1] ([1]Shizuoka Univ., Science, [2]Shizuoka Univ., Green, [3]Univ. of Tokyo)

【目的】光は光質（波長）、光量（強度）、照射場所、照射時間という 4 つのパラメーターを自由に制御することが可能なツールであり、数多くの分析技術に利用されている。最近では、光合成生物を始めとする様々な生物のゲノム情報から光を感知する「光受容体」が単離・同定され、その諸性質が明らかにされている。光受容体は色素タンパク質の一種であり、特定の波長光を吸収することによって光変換（可逆的な分子構造の変化）を示す。この特徴的な特性を利用し、光操作によって生物活性を制御する「光スイッチ」の開発を目指す光遺伝学（オプトジェネティクス）が急速に発展している中で、哺乳類に対して非侵襲、高浸透である長波長光を感知する光受容体が特に注目を浴びている。一方、シアノバクテリアのみがもつ光受容体である「シアノバクテリオクロム（CBCR）」はビリン色素を結合することで光変換を示すが、本研究室では、シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 に由来する CBCR・AnPixJg2 を基盤にした光スイッチの開発 [1]、哺乳類を始めとする様々な生物に存在し、天然物の中で最も長波長の光を吸収するビリン色素・ビリベルジン（BV）を結合する CBCR の発見 [2,3] に成功している。そこで、本研究では BV を結合する CBCR を利用した長波長光感知型光スイッチの開発を目指し、AnPixJg2 を基盤にして、BV を効率的に結合するための分子機構と光依存的な分子間相互作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】CBCR のアミノ酸配列と分子構造の情報を基に BV の結合に関与すると思われるアミノ酸残基を抽出し、各か所に部位特異的変異導入を施した。各変異型 CBCR を His タグ融合タンパク質として BV 産生大腸菌内で発現した後、Ni アフィニティークロマトグラフィーよって精製を行い、光化学的、生化学的な諸性質を解析した。
【結果】*In silico* 解析により BV の結合に関与すると思われる８つのアミノ酸残基が抽出され、全ての位置に変異導入を施した結果、BV を結合させることに成功した。さらに野生型のアミノ酸残基に戻す変異導入を繰り返すことで、最終的に４つのアミノ酸残基が BV の結合効率とアポタンパク質の発現効率に重要であることを明らかにした。また、この BV 結合型 CBCR の結晶化を行い、X 線結晶構造解析によって詳細な分子機構を明らかにした。加えて、CBCR が光依存的に会合状態を変化させることも見出した。

1. Fushimi, K. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 2017. **2.** Narikawa, R. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2015.
3. Fushimi, K. *et al.*, *Front. Microbiol.*, 2016.

Optogenetics, Cyanobacteriochrome, Biliverdin

講演番号：3A15a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A15 会場

ゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーニングによるアポトーシス誘導物質 JBIR-140 の標的経路の解析

Target pathway analysis of an apoptosis inducer JBIR-140 using genome-wide shRNA library screening

○高瀬 翔平[1,2]、近藤 恭光[3,4]、鈴木 健裕[5]、堂前 直[5]、新家 一男[6]、長田 裕之[3,4]、久城 哲夫[2]、松本 健[1,7,8]、吉田 稔[1,7,8] ([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]明治大院・農、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 CSRS・創薬ケミカルバンク、[5]理研 CSRS・生命分子解析、[6]産総研・創薬基盤、[7]理研・化学遺伝学、[8]理研 CSRS・創薬シード)

○Shohei Takase[1,2], Yasumitsu Kondoh[3,4], Takehiro Suzuki[5], Naoshi Dohmae[5], Kazuo Shin-ya[6], Hiroyuki Osada[3,4], Tetsuo Kushiro[2], Ken Matsumoto[1,7,8], Minoru Yoshida[1,7,8] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [3]Chem. Biol. Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Chem. Bank Unit Drug Discov., RIKEN CSRS, [5]Biomol. Charact. Unit., RIKEN CSRS, [6]Biotech. Res. Inst. Drug Discov., AIST, [7]Chem. Genet. Lab., RIKEN, [8]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS)

植物、微生物が生産する天然有機化合物にはユニークな構造を持ち、特徴的で強力な生理活性を有するものが多い。そのような生理活性物質の標的を同定することによって、これらの化合物をバイオプローブとして活用でき、基礎研究の発展に貢献する上で重要である。そこで本研究は、プール型 shRNA ライブラリーと次世代シークエンサーを駆使してゲノムワイドな RNAi スクリーニングを行い、生理活性物質による細胞増殖抑制に関わる遺伝子を特定することを目的とした。このバイアスのない網羅的解析技術は、生理活性物質の作用機構解析に対して強力な手法の 1 つであり、新規の生物学的知見を得られる可能性がある。

本研究で解析した JBIR-140 は放線菌 Streptomyces olivoviridis より単離された Thioviridamide の構造類縁体である。Thioviridamide は、ラット線維芽細胞 3Y1 にアデノウイルス E1A を発現させた細胞において顕著に細胞増殖阻害を引き起こすチオアミド結合を複数有したペプチドで、その増殖阻害活性はアポトーシスによるものであることがわかっている。また、幾つかのヒト腫瘍細胞において JBIR-140 が Thioviridamide よりも強力な増殖阻害活性を有することが示されている。しかし、JBIR-140 の作用機序は未だ解明されていない。そこで、本研究ではまず JBIR-140 の細胞増殖抑制に関わる遺伝子を同定するため、ヒト HeLa S3 細胞での shRNA ライブラリースクリーニングを行った。その結果、ミトコンドリアタンパク質や翻訳関連因子の遺伝子をノックダウンしたとき、見かけ上細胞の JBIR-140 感受性が低くなることが明らかとなり、これらが標的経路に関わると示唆された。また、トランスクリプトームやメタボローム解析、化合物ビーズを用いた結合タンパク質の同定等の手法を組み合わせ、JBIR-140 の標的を探索した。結果として JBIR-140 はミトコンドリア呼吸鎖 complex V を阻害することで統合ストレス応答の 1 つである GCN2 のリン酸化を介した ATF4 の発現上昇を引き起こすことが明らかとなり、E1A の発現がこの作用機構に何らかの影響を与えていることが示唆された。また、JBIR-140 処理によりミトコンドリア形態の変化も観察された。以上のことより、JBIR-140 はミトコンドリアに作用することによって細胞死を誘導していることが示唆された。

shRNA library screening, target identification

講演番号：3A15p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A15 会場

EPA・DHA によるメラニン合成抑制およびメラノーマ細胞腫瘍増殖抑制機構の解明

Study of the mechanisms of suppression melanin synthesis and tumor growth in melanoma by EPA and DHA.

○箱崎 真友佳[1]、山下 哲郎[2]、山田 秀俊[1] ([1]岩手生工研、[2]岩手大・農)
○Mayuka HAKOZAKI[1], Tetsuro YAMASHITA[2], Hidetoshi YAMADA[1] ([1]Ibrc, [2]Iwate Univ.)

EPA・DHA には広範な生理活性があり、EPA・DHA による生理活性発揮のメカニズムとしてエイコサノイド等の代謝産物による受容体を介した作用とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）の活性化による作用がよく知られているが、それだけでは説明のつかない活性が複数存在する。我々は、EPA・DHA の広範な生理活性を説明しうる新たな作用機序の解明を目指して、EPA・DHA 結合蛋白質を解析し、EPA・DHA が Dynein, Importin, Exportin, Tubulin といった、細胞内輸送に関わる蛋白質と結合することを見出した。そこで、EPA・DHA と蛋白質の細胞内局在に着目し、細胞内小器官における蛋白質輸送機構のモデル細胞であるメラノーマ細胞を用いて研究を行っている。

メラノーマ細胞はメラニン産生細胞であるメラノサイトががん化した細胞であり、メラニン合成と腫瘍増殖という特徴を持つ。これまでに我々は、マウス由来のメラノーマ細胞株（B16F10）を用いて、EPA・DHA がメラノーマ細胞におけるメラニン減少と細胞増殖抑制に働くことを見出しており、本研究ではそのメカニズム解明に取り組んだ。

B16F10 細胞を 50μM の EPA・DHA 含む培地で培養し、メラニン合成酵素のチロシナーゼ（Tyr）およびチロシナーゼ関連酵素（Tyrp1）の細胞内局在、Tyr の基質であるチロシンと代謝物であるドーパ、細胞周期について解析した。

EPA によって Tyr 総蛋白質量に変化は観察されなかったが、膜に局在する Tyr が減少していた。また、Tyrp1 も細胞膜周辺の蛋白質量が減少しており、EPA によるメラノソームへのメラニン合成酵素の膜局在抑制が観察された。さらに、細胞内のチロシン量も減少しており、EPA は細胞内のチロシン量を低下させるとともに、メラニン合成に働く酵素の膜局在を抑制することでメラニン合成を抑制していると考えられた。続いて、DHA のメラノーマの細胞周期に対する作用を解析し、DHA は細胞増殖の遅延と細胞質分裂期（M 期）細胞の増加を引き起こすことを見出した。Tyr および Tyrp1 メンブレントラフィックと G2/M 期での細胞周期遅延のメカニズムについて検討するため、メンブレントラフィック制御蛋白質 Rab32/38/27 および細胞骨格に対する EPA・DHA の作用を解析し、EPA・DHA が F-Actin 抑制に働くことを見出した。現在は、F-Actin 抑制を介したメラニン合成抑制および腫瘍増殖抑制について解析を行なっている。

EPA/DHA, Melanin, Tumor growth

発表責任者：山田 秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：3A15p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A15 会場

カビ毒オクラトキシン A が示すエピジェネティック変異原活性の可視化検出

Simple detection of the epigenetic activity of Ochratoxin A

○杉山 圭一、古沢 博子、グルーズ ピーター、本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所）
○ Kei-ichi SUGIYAMA, Hiroko FURUSAWA, Petr GRUZ, Masamitsu HONMA (National Institute of Health Sciences)

【背景】発がん機序にエピジェネティック制御のかく乱が指摘されるなか、抗がん剤のスクリーニングの観点からもエピジェネティック変異原検出系の重要性が増している。我々は既にヒト DNA methyltransferase （*DNMT*）遺伝子形質転換酵母（ヒト *DNMT* 酵母）が凝集性を獲得し、凝集遺伝子 *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルが亢進していることを明らかにしている。さらに、この凝集性は DNMT 阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に可逆的に応答し、エピジェネティック制御下にあることも報告している [1-3]。*FLO1* 活性化を指標とした本エピジェネティック変異原検出系は、現時点で短期間でかつ包括的にエピジェネティック変異原活性を検出できる可能性を有する唯一の系となる。
【目的】可視化可能な酵母凝集性等を指標に、本検出系を用いて DNA 変異原活性化が不明にもかかわらず発がん性を有するとされる化学物質のエピジェネティック変異原活性ついて検討した。非発がん性と考えられるカビ二次代謝産物 mycotoxin の 1 つ deoxynivalenol（DON）を陰性対照に、同じく mycotoxin で発がん機序が明確にされていない Ochratoxin A（OTA）を被検物質に使用した。
【方法】凝集レベルは画像より半定量化し、*FLO1* 遺伝子の転写レベルは RT-PCR および GFP を用いた *FLO1* レポーターアッセイ系により解析した。DNA メチル化酵素阻害活性は、同酵素の 1 つ *M. Sss* I に対する阻害作用により、また DAPI を用いた核染色像の観察によりクロマチン構造に対する影響も検討した。なお、ヒト *DNMT* 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母に同時形質転換した株を使用した。
【結果および考察】ヒト *DNMT* 酵母が示す凝集性を OTA（0 – 50 μM）は濃度依存的に抑制し、*FLO1* 転写レベルの抑制も確認された。一方、DNMT の基質となる CpG 配列の一部を TpA 配列に置換した *FLO1* レポーター活性に対する OTA の抑制作用は認められなかった。ヒト *DNMT* 酵母が示すクロマチン構造の拡散傾向を OTA は抑制し、同剤による *M. Sss* I メチル化酵素の活性阻害効果も検出された。なお、DON による *FLO1* レポーター活性の抑制は 200 μM においても認められなかった。以上の結果は、OTA が DNA メチル化阻害活性を有するエピジェネティック変異原である可能性と、本検出系が短期にエピジェネティック活性を検出できることを示唆している。

1) Sugiyama, K., *et al.*, *Mutagenesis* **31,** 687-693 (2016).
2) Sugiyama, K., *et al.*, *Mutagenesis* **32,** 429-435 (2017) .
3) Sugiyama, K., *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, (in press).

epigenetic mutagen, ochratoxin A, DNA methylation

発表責任者：杉山圭一（sugiyama@nihs.go.jp）

講演番号：3A15p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A15 会場

新しいタイプのヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin の作用機構
Mode of action of a new type of histidine kinase inhibitor waldiomycin

○長尾 勇希[1]、岡島 俊英[2]、五十嵐 雅之[3]、江口 陽子[4]、清水 莉子[1]、犬飼 洋一[1]、村井 春香[5]、加藤 明宣[1]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院農、[2]阪大産研、[3]微化研、[4]近畿大生物理工、[5]近畿大農)
○ Yuuki NAGAO[1], Toshihide OKAJIMA[2], Masayuki IGARASHI[3], Yoko EGUCHI[4], Riko SHIMIZU[1], Yoichi INUKAI[1], Haruka MURAI[5], Akinori KATOU[1], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Graduate School of Agriculture Kindai Univ., [2]Osaka Univ., [3]Institute of Microbial Chemistry, [4]Faculty of Biology-Oriented Science and Technology Kindai Univ., [5]Faculty of Agriculture Kindai Univ.)

細菌は様々な環境ストレスに適応するため、ヒスチジンキナーゼ（HK）とレスポンスレギュレーター（RR）からなる情報伝達機構、すなわち二成分制御系（TCS）を保持している。これまでに、我々は、グラム陽性細菌の増殖に必須な保存性 TCS、WalK (HK)/WalR(RR)に着目して、その阻害剤の開発研究を行ってきた。その結果、枯草菌、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）等のグラム陽性細菌の WalK ばかりでなく、EnvZ を含む大腸菌のクラス I タイプ HK をも阻害する抗生物質として、waldiomycin を放線菌より見出した（1, 2)。加えて、EnvZ を用いて、1) DHp 領域の Hbox 内に高度に保存されたアミノ酸残基 S242、D244、T247、および P248 のアラニン置換体が、waldiomycin に対して顕著な耐性化を示すこと、2) waldiomycin が細菌 HK の H-box に作用することを明らかにしている(2)。本研究では、さらに waldiomycin に顕著に耐性化を示した $EnvZ_{223\text{-}289}$（DHp）のアラニン置換体の X 線結晶構造解析を行うとともに、in vivo での HK 阻害活性を解析したので報告する。

$EnvZ_{223\text{-}289}$ 変異体（S242A、T247A、P248A）タンパク質を精製し、結晶化、X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定した。その結果、S242A と T247A では野生型 $EnvZ_{223\text{-}289}$ と同じ立体構造を保持していることが判明した。一方、P248A 変異体では DHp ドメイン内に存在する二つのαヘリックスの内、最初のヘリックスの折曲が消失し、Hbox 周辺の立体構造が大きく変わっていた。これらの結果は、S242、T247 と waldiomycin との相互作用による waldiomycin の Hbox への結合による HK 活性阻害モデルを支持した。枯草菌において、発現させた全長 EnvZ（野生型、S242A, T247A）に対して、自己リン酸化反応を Phos-tag SDS-PAGE を用いて、解析した結果、waldiomycin は野生型 EnvZ の自己リン酸化は阻害したが、S242A, T247A 変異体の自己リン酸化は阻害しなかった。また、waldiomycin の枯草菌と大腸菌の外膜変異株に対する抗菌性を調べた結果、抗菌性（MIC,3.13,12.5 μg/ml）を示したが、枯草菌に対しては、殺菌的に、大腸菌外膜変異株に対しては、静菌的に作用することが明らかになった。これらの結果は、waldiomycin が大腸菌においては、多くのクラス I タイプ HK を同時に阻害し、増殖を阻害する一方、枯草菌においては、増殖に必須な HK, WalK が主に阻害されて、致死的に作用すると理解された。このように、waldiomycin は複数の情報伝達系を阻害する広域スペクトル HK 阻害剤であり、Hbox を標的とする初めてのモデルであることが示唆された。

1) Igarashi, M. *et al.* J. Antibiotic. (Tokyo) 66, 459-464 (2013)
2) Eguchi, Y. *et al*. J. Antibiotic. (Tokyo) 70, 251-258 (2017)

histidine kinase inhibitor, two component system, waldiomycin

発表責任者：内海　龍太郎（utsumi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A15p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A15 会場

二次代謝誘導ペプチド goadsporin の作用機構
The mode of action in goadsporin which induced secondary metabolism in actinomycetes
○金田 彬[1]、尾崎 太郎[1]、菅井 佳宣[1]、浅水 俊平[1]、千田 俊哉[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]高エネ研)
○Akira KANADA[1], Taro OZAKI[1], Yoshinori SUGAI[1], Shumpei ASAMIZU[1], Toshiya SENDA[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KEK)

【目的・背景】Goadsporin (GS) は *Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産するペプチドで、生産菌以外の放線菌に対して二次代謝を亢進する作用や抗菌活性を持つことが報告されている。 GS 生合成遺伝子クラスター内にコードされている自己免疫を担う遺伝子 *godI* が、Ffh のホモログをコードしていることや、ゲノム中にもう 1 コピーの *ffh* が存在することから、GS の作用点が Ffh であることが予想された。 Ffh は 4.5S RNA と共に signal recognition particle (SRP) を形成し、翻訳中のペプチドの N-末端に存在するシグナル配列との相互作用を介してタンパク質の輸送や局在を制御している。これまで SRP をターゲットにした薬剤は報告されておらず、GS の詳細な作用機構に興味が持たれた。我々は既に GS 生産菌の Ffh が GS と相互作用する一方で GodI は相互作用しないことを示しており、さらに GS が広義の放線菌である *Mycobacterium tuberculosis*、*Corynebacterium diphtheriae* の Ffh とも相互作用することを示していた（2017 年、日本農芸化学会大会）。 今回、より詳細に作用機構を解明するために、GS と相互作用するアミノ酸残基の特定を行った。 さらに、GS が医薬として利用可能かを検証するために、*Corynebacterium glutamicum* に対する抗菌アッセイを行った。
【方法】他の微生物由来 Ffh においてシグナル配列と相互作用することが報告されている残基の内、放線菌の Ffh で保存されている残基を絞り込んだ。 候補に挙がった残基を置換した変異型 Ffh を大腸菌により組み換えタンパク質として発現させ、二段階の精製ステップにより調製した。 この変異 Ffh をリガンド、GS をアナライトとして表面プラズモン共鳴分析法 (Biacore) により定量的な相互作用の解析を行った。 さらに、*C. glutamicum* 及び、細胞壁を構成しているミコール酸の生合成遺伝子である *pks13* を欠損させた株（*Δpks13*）に対して GS を用いた disk-diffusion assay を行った。
【結果】*In vivo*、*in silico* の解析により、Ffh の M ドメインに存在する 426 番目の Ala が相互作用に重要であることが示唆された。 そこで A426T Ffh を調製し GS との相互作用を解析した結果、野生型では 7.0 nM だった解離定数が 80.1 nM に上昇していた。 相互作用が 1/10 に減少していたことから、この残基が GS との相互作用に重要であることが示された。 さらにこの残基が Ffh とシグナル配列の相互作用に重要であることから、GS が Ffh とシグナル配列の相互作用を阻害することで活性を示すことが示唆された。 また、*in vivo* での GS の抗菌アッセイの結果 GS が *C. glutamicum* にに対して活性を示さなかった一方で、*Δpks13* 株では阻止円が確認された。このことから、GS をベースにした抗菌剤の開発には膜透過性の改善が重要であることが示された。

signal recognition particle, mode of action, RiPPs

講演番号：3A15p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A15 会場

cyclo(L-Ala-L-Pro) のアフラトキシン生産阻害機構の解明

The mode of action of cyclo(L-Ala-L-Pro) for inhibiting aflatoxin production

飯村 九林[1]、古川 智宏[1]、山本 利義[1]、根岸 瑠美[2]、鈴木 道生[1]、○作田 庄平[1] ([1]東大院農生科、[2]東大分生研)
Kurin IIMURA[1], Tomohiro FURUKAWA[1], Toshiyoshi YAMAMOTO[1], Rumi NEGISHI[2], Michio SUZUKI[1], ○Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]IMCB, The Univ. of Tokyo)

【目的】アフラトキシン (AF) による農作物の汚染により、45 億人が潜在的な健康リスクに曝され、汚染農作物の破棄により甚大な経済的被害が生じている。現在 AF 汚染問題を抜本的に解決できる汚染防除法は無く、その開発が急がれている。我々は、AF 生産菌の生育を阻害せずに、AF 生産を特異的に抑制する微生物や微生物の代謝産物が、AF 汚染防除に有効であると考え、AF 生産阻害物質生産菌の探索を行って来た。見出した AF 生産阻害物質の作用機構の解明は、AF 生産機構の全体像の解明につながり、それは新たな汚染防除法を開発するために重要である。これまでに我々は、*Stenotrophomonas* sp. が生産する cyclo(L-Ala-L-Pro)が、AF 生合成における鍵転写因子である AflR の発現を抑制することで選択的な AF 生産阻害活性を示し、また、生産菌がバイオコントロール剤として有用であることを見出した。本研究では、cyclo(L-Ala-L-Pro)の標的タンパク質を同定し、作用機構を解明することを目的とする。

【方法および結果】cyclo(L-Ala-L-Pro)を固定化した Sepharose ビーズを用いて、*Aspergillus flavus* から抽出したタンパク質溶液中の cyclo(L-Ala-L-Pro)結合タンパク質を精製した。その結果、glutathione *S*-transferase（AfGST）が結合タンパク質として同定された。cyclo(L-Ala-L-Pro)は組換え AfGST に結合し、その GST 活性を阻害した。AfGST は *Aspergillus* 属に特有のアミン酸配列を持つ GST で、*A. flavus* において、AfGST の発現の経時変化は AF 生産とパラレルであった。GST 阻害剤として知られる ethacrynic acid は AfGST の GST 活性を阻害し、*A. flavus* の生育を阻害せずに AF 生産を抑制し、また、AflR の mRNA レベルを低下させた。ethacrynic acid は *Schistoma japonicum* GST (ShGST)を阻害したが、cyclo(L-Ala-L-Pro)は ShGST を阻害しなかった。以上より、cyclo(L-Ala-L-Pro)は AfGST を阻害することにより AF 生産を抑制し、AfGST の阻害剤は AF 生産阻害剤として有効であることが示された。

【謝辞】本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われたものである。

Aspergillus flavus, Cyclo(L-Ala-L-Pro), diketopiperazines

発表責任者：作田庄平（asakuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A15p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A15 会場

オートファジー阻害剤テトランドリンの作用機序の解析

Elucidation of mechanism by which tetrandrine inhibits autophagy pathway

○宮前 友策[1,2]、西藤 有希奈[2]、臼井 健郎[1]、増田 誠司[2]、神戸 大朋[2]、永尾 雅哉[2]（[1]筑波大生命環境、[2]京大院生命）
○ YUSAKU MIYAMAE[1,2], YUKINA NISHITO[2], TAKEO USUI[1], SEIJI MASUDA[2], TAIHO KAMBE[2], MASAYA NAGAO[2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Kyoto Univ.)

【目的】オートファジーは、栄養飢餓や異常タンパク質の蓄積に応答して細胞内のタンパク質やオルガネラを自己分解し、再利用する品質管理機構である。近年、がんや肝疾患、神経変性疾患などの疾病との関連が次々と明らかにされており、同経路を制御する化合物は有望な創薬候補化合物として期待されている。演者らは、肝硬変の成因である肝線維化を阻害する化合物を探索する過程でツヅラフジ科植物に含まれるビスベンジルイソキノリンアルカロイドであるテトランドリン (Tet)に、オートファジーを阻害する作用のあることを見出し、過去の本大会にて報告した[1), 2)]。本研究では、本化合物の作用点の解析を行い、詳細な作用機序の解析を行った。

【結果】先行研究において、プロテアーゼ阻害剤ならびに mRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 を安定に発現する細胞株を用いた解析により、Tet がオートファジーflux を阻害することを見出している。本化合物は、細胞内で Ca^{2+} ATPase を標的とし、その機能を阻害することが知られるが、オートファジー阻害活性のメカニズムとの関連性は薄く、他の因子を標的としている可能性が考えられた。本研究では、まずリソソームの機能に影響を与えるか検討を行った。リソソームの pH 調整に主要な役割を果たす V-Type ATPase に対して阻害作用を示すか、*in vitro* アッセイにより検討を行ったところ、既存の V-Type ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A_1 ($BafA_1$)とは異なり一切阻害活性を示さなかった。また、Tet を処理した細胞において、アクリジンオレンジを用いて酸性小胞を染色した結果、$BafA_1$ で観察されるような蛍光の消失が全く観察されなかったことから、Tet はリソソームの機能に関わる因子とは異なる因子を標的としている可能性が強く示唆された。そこで、リガンド固定化ビーズを用いて標的分子の直接同定を試みた。活性に影響を及ぼさない部分構造を明らかにするため、種々の類縁化合物を用いた構造-活性相関を検討したところ、Tet のジアステレオマーであるイソテトランドリン (Isotet)が Tet と全く同様の活性フェノタイプを示すことが明らかになった。これらは同一の標的を有すると考えられたため、Isotet を Tet の“surrogate”とし、Isotet の標的分子を同定した後、Tet がその分子を同じく標的とするか検証を行う方針を立案した。Isotet のビーズへの固定化は、Isotet のメトキシ基の一つが水酸基に置き換わったベルバミン (Ber)を利用した。Ber の水酸基にアルキン基を導入した後、フイスゲン反応によりアジド化ナノ磁気製ビーズに固定化し、全細胞抽出液、細胞質画分、膜画分のそれぞれから、標的分子のアフィニティ精製を行い、複数の結合タンパク質のバンドを得た。

[1)]宮前ら，日本農芸化学会 2012 年大会、[2)]西藤ら，日本農芸化学会 2014 年大会

【謝辞】本研究は科研費研究活動スタート支援 (No.23880015)、若手(B) (No.26870309)の支援により行われました。

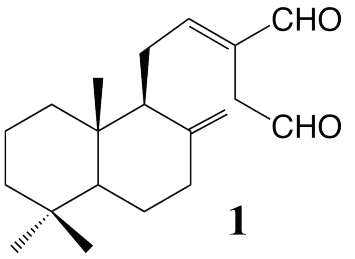
tetrandrine, autophagy

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

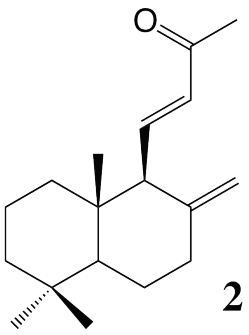
講演番号：3A15p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A15 会場

インド産マンゴージンジャー根茎由来テルペン類の酵素阻害活性
α-Glucosidase and lipase inhibitors in mango ginger rhizome
○森本 正則[1]、和田 拓人[1]、星野 麻耶[1]、吉岡 百合[2]、松村 晋一[2]([1]近畿大農、[2]稲畑香料)
○Masanori MORIMOTO[1], Hiroto WADA[1], Maya HOSHINO[1], Yuri YOSHIOKA[2], Shin-ichi MATSUMURA[2] ([1]Kindai Univ., [2]Inabata Koryo Co.,Ltd.)

【目的】インドで食用とされるショウガ科マンゴージンジャー（*Curcuma amada* Roxb.）根茎に含まれる二次代謝産物は、これまでに細胞毒性や抗菌活性をはじめ多様な生理活性が報告されている。本研究では、インド産マンゴージンジャー乾燥根茎に含まれる成分の調査と健康食品としての機能性指標の一つとして、それら構成成分のα-グルコシダーゼ阻害活性とリパーゼ阻害活性を評価した。
【方法と結果】マンゴージンジャー乾燥根茎は、各種有機溶媒で抽出して抽出物を調製した。これらを用いた酵素阻害活性試験の結果より、低極性溶媒で有効成分が効率よく抽出されていた。そこで、ヘキサン抽出物からシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて構成成分の精製を行った。その結果、主成分として既知化合物であるラブダン型ジテルペンの(*E*)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial(**1**)と炭素数 18 の(*E*)-dinorlabda-8(17),11-diene-13-one(**2**)を単離･同定した。これらのα-グルコシダーゼ阻害活性は、ラット小腸由来アセトンパウダー由来の粗α-グルコシダーゼに対して基質として *p*-nitrophenyl-α-glucose を用いた阻害活性試験を実施した。その結果、ジアール体である化合物 **1** は、ポジティブコントロールとして使用したα-グルコシダーゼ阻害薬の一つである acarbose の 20 分の 1 程度の阻害活性を示した。さらに単離した化合物のリパーゼ阻害活性は、基質として 4-methylumbelliferyl oleate を用いてブタ膵臓由来リパーゼの作用によって遊離する umbelliferone の蛍光を蛍光検出 HPLC で分離定量した。単離した両化合物のリパーゼ阻害活性については、25 μM の処理濃度でリパーゼ活性をほぼ完全に阻害する程度であった。これらの結果より、インド産マンゴージンジャー根茎は、生活習慣病に関わる食後の血糖値上昇に関わる糖類分解酵素と脂質代謝に関わる脂肪分解酵素に作用することから、生活習慣病の予防に有効な植物材料として利用可能であることが示唆された。加えて、天然物として単離同定した化合物とそれらを化学修飾した誘導体の酵素阻害活性についても合わせて報告する。



1



2

mango ginger, α-glucosidase, lipase

発表責任者：森本正則（masanori@nara.kindai.ac.jp）

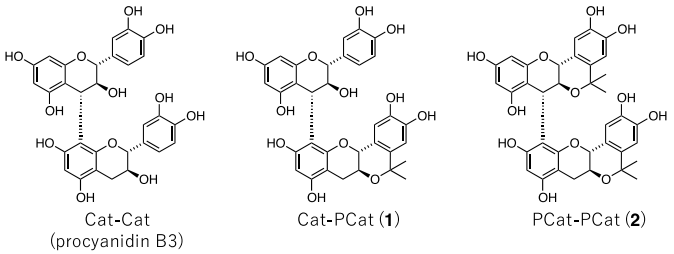
講演番号：3A15p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A15 会場

アミロイドβによる神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発

Design and synthesis of proanthocyanidin derivatives as an inhibitor of amyloid ß aggregation

○水野 美麗[1]、森 一憲[1]、中西 郁夫[2]、松本 謙一郎[2]、柴沼 質子[1]、福原 潔[1] ([1]昭和大薬、[2]放医研)
○Mirei MIZUNO[1], Kazunori MORI[1], Ikuo NAKANISHI[2], Ken-ichiro MATSUMOTO[2], Motoko SHIBANUMA[1], Kiyoshi FUKUHARA[1] ([1]Showa Univ., [2]NIRS)

【目的】既存のアルツハイマー病(AD)治療薬は、対症療法にすぎず、根本的治療が可能な医薬品は未だ開発されていない。AD の病理学的特徴に、アミロイドβ(Aβ)凝集時に発生する活性酸素及びその凝集体(老人斑)による神経細胞毒性があげられる。クルクミンやシリビニンをはじめとする天然抗酸化物質は、Aβ凝集阻害作用を有するがその作用は決して強力ではない。当研究室では、天然抗酸化物質であるカテキンの立体構造を固定化した「平面型カテキン(PCat)」を開発した。立体構造を固定化することで、抗酸化活性及びAβ凝集阻害作用が増強することを明らかにした。
そこで我々は、カテキンの重合体で高い抗酸化活性を持つプロアントシアニジンに着目した。これはぶどうの種やピーナッツの皮に多く含まれ、重合度が高いほど抗酸化作用が増強することが知られている。プロアントシアニジンに PCat を導入することで、更なる抗酸化活性とAβ凝集阻害作用の増強が期待できる。本研究では、血液脳関門の透過性を考慮して(+)-catechin の二量体である procyanidin B3 (Cat-Cat)をもとに、一方及び両方のカテキンの立体構造を固定化した新規誘導体 **1** (Cat-PCat)と **2** (PCat-PCat)を設計・合成し、Aβによる神経細胞毒性への予防効果について詳細な検討を行った。
【方法・結果・考察】
＊抗酸化活性の評価：活性酸素種のモデル化合物であるガルビノキシルラジカルと Cat-Cat, **1**, **2** との反応をストップトフロー分光測定装置で速度論的解析を行った。その結果、PCat-PCat(**2**) > Cat-PCat(**1**)> Cat-Cat となり、立体構造の固定化により抗酸化活性が増大することがわかった。
＊Aβによる神経細胞毒性の抑制作用：ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y を用いて、MTT assay 法により評価した。PCat-PCat(**2**)は、Cat-Cat や Cat-PCat(**1**)に比べて、Aβによる細胞死を強力に抑制することが明らかとなった。
これらの結果から、カテキンの立体構造を固定化することにより、抗酸化活性のみならず神経細胞毒性の抑制効果も増大することがわかった。我々は、これらの化合物が示す神経細胞毒性抑制作用が Aβ凝集阻害作用によるものか明らかにすべく、Thioflavin T assay を用いて検討を行った。



Alzheimer's disease, proanthocyanidin, amyloid ß

発表責任者：水野　美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3A15p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A15 会場

α-GalNAc-ase 阻害剤のマクロファージ活性化タンパク質 GcMAF への影響

Protective effect of inhibitor against α-GalNAc-ase on GcMAF

○蟹江 善美、前川 侑也、蟹江 治（東海大工）
○Yoshimi Kanie, Yuya Maegawa, Osamu Kanie (Tokai Univ.)

Gc プロテインは *N*-および、*O*-型糖鎖を有するタンパク質で、血中でビタミン D やその分解物の輸送に関与していることが知られている。また *O*-型結合型α-GalNAc を有する Gc プロテインは、GcMAF と呼ばれ、マクロファージ活性能を有する。がん患者では免疫機能の低下がみられ、GcMAF の投与によって症状が改善されるが、その効果が持続しないとの報告がある。本研究では、がん患者の血中においてα-GalNAc を切断する *N*-アセチルガラクトサミニダーゼ（α-GalNAc-ase）の活性が上昇することに着目し、これらの酵素の阻害剤となりうる合成イミノ糖誘導体を用い、α-GalNAc-ase による活性型 GcMAF の分解を抑制し、GcMAF 機能の持続性向上を目指した。

最初に、ヒト肝がん由来株化細胞 HepG2 の粗タンパク質抽出液中のα-GalNAc-ase 活性を PNP-α-GalNAc を基質として調べたところ、数十 nmol/mg/h の活性を確認した。一方、イミノ糖誘導体は、ニワトリ肝臓由来のα-GalNAc-ase にナノモルオーダーの阻害能を示した。これらの結果に基づきイミノ糖誘導体を用いて HepG2 粗タンパク質に対する阻害活性の検討を行ったところ、数 100 nM の IC_{50} が示された。

さらに、ヒト由来 Gc プロテイン中の *O*-型糖鎖の組成を調べた。Gc プロテインをプロテアーゼ消化した後、固相抽出カーボンカラムを用いアセトニトリルの濃度勾配条件下溶出した画分を LC-MS で分析した。その結果、Gc プロテインの *O*-型糖鎖(Sia-Gal-GalNAc)修飾体の存在を確認した。そこで、Gc プロテインを阻害剤と HepG2 粗タンパク質抽出液とともに混合し、Gc プロテインの GalNAc 修飾体の分解を調べたところ、GalNAc のみの保護作用については確認できなかった。一方、全長糖鎖 Sia-Gal-GalNAc 修飾体の保護作用が確認された。本阻害剤がα-シアリダーゼ活性を有さないことから、endo-型 GalNAc-ase に対する阻害剤となっている可能性が示唆される一方、シアル酸が切断されなかった原因についてさらに調査する必要がある。

α-GalNAc-ase, inhibitor, GcMAF

発表責任者：蟹江　善美（yoskanie@yahoo.co.jp）

講演番号：3A15p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A15 会場

Trichoderma sp. USF-2690 の産生する sorbicillinoid 類及び bisorbicillinoid 類の抗炎症活性に関する研究

Anti-inflammatory study of sorbicillinoids and bisorbicillinoids produced from *Trichoderma* sp. USF-2690

○高橋 愛佳[1]、寺島 健仁[1]、飯塚 涼太[2]、國方 真希[2]、菅谷 紘一[2]、小野瀬 淳一[2]、阿部 尚樹[2] ([1]東農大院・食品栄養、[2]東農大・応生)

○ Aika TAKAHASHI[1], Takehito TERAJIMA[1], Ryota IDUKA[2], Maki KUNIKATA[2], Koichi SUGAYA[2], Jun-ichi ONOSE[2], Naoki ABE[2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutri. Sci. and Food Safety, Faculty of Appl. Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】*Trichoderma* sp. USF-2690 株の産生する sorbicillinoid 類並びにその二量体である bisorbicillinoid 類は、多彩な炭素骨格を持つ化合物群であり、強い DPPH ラジカル補足活性を有している。また、bisorbicillinoid 類である bisvertinolone にはβ-1, 6-glucan 合成阻害活性、trichodimerol には LPS 刺激単球系細胞に対する COX 合成阻害に基づく TNF-α産生阻害活性、dihydrotrichodimerol にはペルオキシソーム増殖活性受容体γ活性化作用などが報告されていることなどから、ユニークな生理活性を有する化合物群として、生理活性の面からも近年注目されている化合物群である。本研究室でも USF-2690 株から単離した bisorbicillinol, sorbicillin, trichodimerol, bisvertinolone および 5-epihydroxyvertinolide を用いて抗原刺激ラット好塩基球系 RBL-2H3 細胞からの脱顆粒を指標とした抗アレルギー活性の検討を行うことにより、これらの化合物が、濃度依存的に脱顆粒の阻害を示すことを報告している。特に bisorbicillinol に関しては、強い TNF-α産生阻害も示したことから、細胞内情報伝達タンパク質発現への影響を検討することで、PKCα発現阻害作用により抗アレルギー作用を示す可能性も示唆した。Bisorbicillinol を含む bisorbicillinoid 類には、さらなる生理活性を示す可能性が予想されることから、本研究では、USF-2690 株から単離した上記以外の sorbicillinoid 類及び bisorbicillinoid 類における抗アレルギー活性を検討するとともに、TNF-α以外の炎症性サイトカイン産生に与える影響についても検討することを目的とした。

【方法】*Trichoderma* sp. USP-2690 株を液体培地にて培養し、その培養液を塩酸にて pH 3.0 に調整し、酢酸エチルにて抽出することにより中・酸性画分を得た。得られた中・酸性画分を Sephadox LH-20 カラムクロマトグラフィー(CH_3OH)に供して分画、得られた各画分を分取用 ODS 系 Capcell pak SG-120 で精製し、bisorbicillinol, sorbicillin, trichodimerol, bisvertinolone に加え、demethyltricodimerol, sorbicillinol（6-acetyl 体として）を単離した。これらを抗 DNP-IgE 抗体によって感作させた RBL-2H3 細胞に処理後、DNP-BSA で刺激後の培養上清についてβ-ヘキソサミニダーゼ放出試験については酵素活性測定試験法にて、TNF-α及び IL-4 産生量については ELISA 法にて測定した。

【結果】Bisorbicillinoid 類の化合物は、いずれもβ-ヘキソサミニダーゼ、TNF-αに加えて IL-4 に対しても濃度依存的な産生阻害活性を示した。特に bisorbicillinol に関しては、10 μM において 50%以上の強い TNF-α及び IL-4 の産生抑制が認められたことから、DNA マイクロアレイに供することによる遺伝子学的な面からの網羅的な阻害メカニズムの解析も検討している。

Trichoderma sp. USF-2690, bisorbicillinoid, anti-inflammatory activity

発表責任者：高橋 愛佳（aika8600@gmail.com）

講演番号：3A16a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A16 会場

(+)-Salinipostin A の不斉合成研究

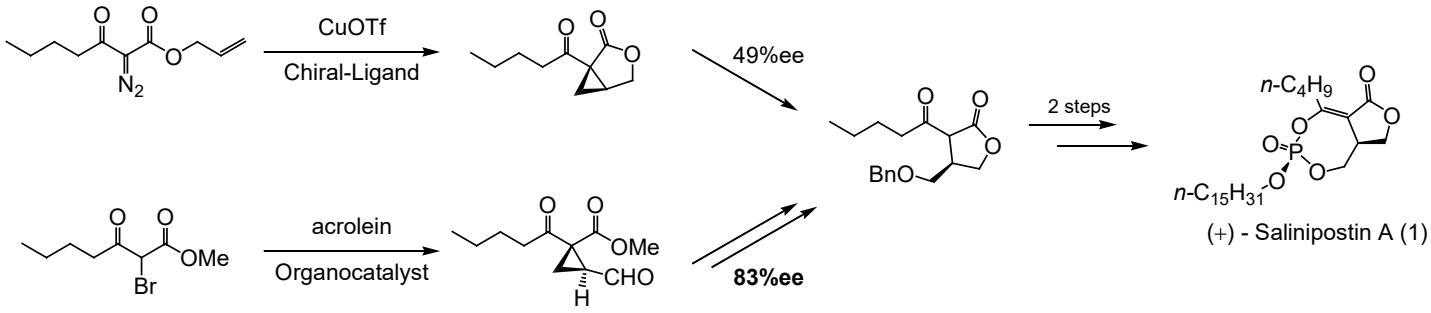
Asymmetric Total Synthesis of (+)-Salinipostin A

○藤岡 孝亘、森 直紀、渡邉 秀典（東大院・農生科）
○Takanobu FUJIOKA, Naoki Mori, Hidenori Watanabe (Tokyo Univ.)

Salinipostin A は海洋放線菌である *Salinispola* sp. から単離・構造決定された [1)]、5 員環ラクトンと 7 員環の縮環構造を持つ、含リン化合物である。生理活性として、マラリア原虫である *Plasmodium falciparum* に対する細胞毒性、すなわち抗マラリア活性を有する。我々は日本農芸化学会 2017 年度大会において本化合物のラセミ体合成を報告した。本大会では本化合物の不斉合成への取り組みを報告する。

2017 年度大会において報告した際に我々は、金属カルベン錯体を経由した不斉シクロプロパン化反応においてキラルな配位子を用いることで立体化学を制御することを今後の方針としてを述べたため本大会ではその結果から報告する。実際の結果としては鏡像体過剰率は 49% ee に留まった。そこで我々は二重結合のカルベン付加反応ではなく、有機分子触媒を用いたシクロプロパン化反応によって立体化学を制御することとした。すなわち、マイケル付加反応と分子内 S_N2 置換反応によってシクロプロパン環を構築し、その際に有機分子触媒の軌道相互作用と立体障害を利用するというものである

。その結果鍵中間体を 83% ee で得ることに成功した。目的の Salinipostin A の鏡像体過剰率は未決定であるが、比旋光度の符号は天然物と一致した。



1) Christopher J. Schulze, Gabriel Navarro, Daniel Ebert, Joseph DeRisi and Roger G. Linington *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 1312-1320

Total Synthesis, anti-maralia, natural product

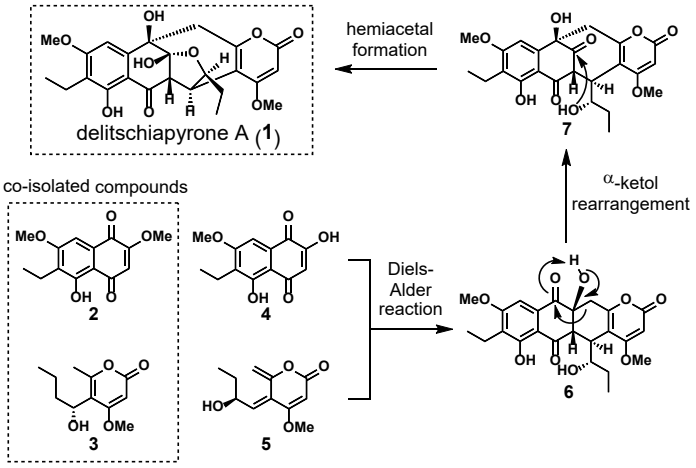
講演番号：3A16a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A16 会場

デリチアピロン A の生合成模倣合成

Bioinspired total synthesis of delitschiapyrone A

○倉沢 一輝[1]、權 垠相[2]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○Kazuki Kurasawa[1], Eunsang Kwon[2], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Science, Tohoku Univ.)

【目的】Delitschiapyrone A (**1**)は、落ち葉に住みつく真菌 *Delitschia* sp. FL1581 から単離・構造決定された多環性ポリケチドである[1]。**1** は種々のヒト腫瘍細胞に対して細胞毒性(IC_{50} = 12-35 μM)を示すことが知られているが、それ以上に特筆すべき特徴として、前例の無い複雑な 6/6/5/7/6 五環性骨格を有する点があげられる。この前例の無いユニークな構造の生合成は、**1** と同時にナフトキノン **2** とピロン **3** が単離されたことから、次のように推定されている。すなわち、**4** と **5** が、Diels-Alder 反応により連結した後に **6** の α-ケトール転位反応が進行し、最後に、生じた **7** の分子内ヘミアセタール形成により **1** が生合成されると推定されている。我々は、ユニークな骨格を生じるこの推定生合成経路を、化学的に効率よく進行させることが可能かどうかに興味を抱いた。そこで本研究では、推定生合成経路を模倣することにより、前例の無い骨格を有する **1** の効率的な初の全合成を目的とした。また、それにより推定生合成経路に関する知見を得ることも視野に入れ、研究に着手した。



【結果】生合成中間体と考えられる **4** と **5** は、それぞれ既知物質から 6 工程と 4 工程で合成することに成功した。これらの化合物を THF 中で加熱し Diels-Alder 反応を行った結果、望みの四環性化合物 **6** が低収率(12%)ながら得られた。反応の副生成物を解析していたところ、驚くべきことに、天然物である **1** も生成していることが判明した。この結果は、Diels-Alder 反応のみならず α-ケトール転位反応と続くヘミアセタール形成が一挙に進行したことを意味する。しかし、このカスケード反応は低収率(4%)であったため、検討を行うこととした。その結果、興味深いことに、化合物 **4** と **5** の混合物(ニート)に水を添加して 35℃で反応させると高収率(75%)で化合物 **1** が得られることを見出した。これにより、わずか 7 工程、通算収率 32%で、前例の無い骨格を有する **1** の初の全合成を達成した。さらに、温和な条件下で化学的に提唱生合成経路が進行したことから、我々は、一連の反応が非酵素条件下で進行することにより **1** が生合成されるのではないかと考えている。

[1] A. A. L. Gunatilaka *et. al*., *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5944-5947.

total synthesis, Diels-Alder reaction, α-ketol rearrangement

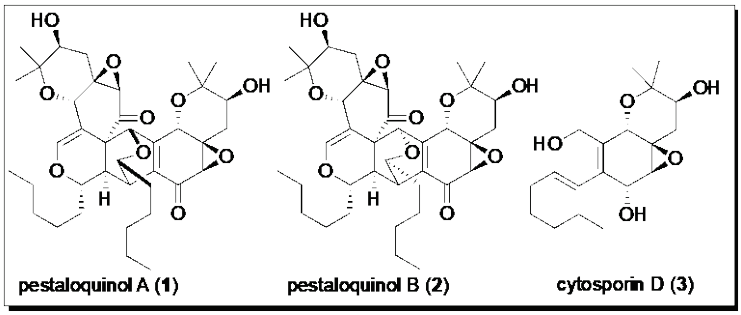
講演番号：3A16a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A16 会場

ペスタロキノール A および B の合成研究

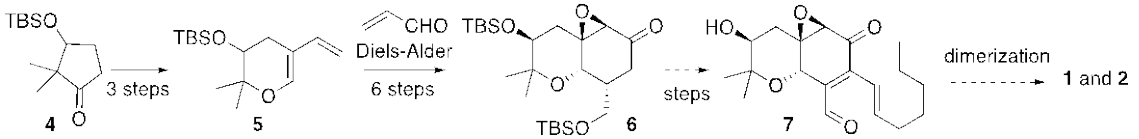
Synthetic Studies of pestaloquinol A and B

○小倉 由資、廣川 高史、陰山 真将、桑原 重文（東北大院・農生科）
○Yusuke Ogura, Takafumi Hirokawa, Masayuki Kageyama, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【緒言】 Pestaloquinol A (**1**)および B (**2**)は、針葉樹イヌマキに内生する *Pestalotiopsis* 属の子嚢菌より単離・構造決定されたポリケチド・テルペノイド複合型メロテルペンであり [1]、同時に単離されたエポキシシキノイドである cytosporin D (**3**)の酸化的二量化反応によって生合成されると推定されている。本化合物は前例の無い 9 環性連続縮環構造を有していることに加えて、14 個の不斉炭素も有している点で、これまでに多数報告されて来たエポキシシキノイド類と比べても極めて特異かつ複雑な構造を有していると言え、有機合成化学的に興味を引く。また、pestaloquinol A および B は HeLa 細胞に対する細胞毒性のみが報告されているが(IC_{50} = 8.8 μM)、類似構造を有している epoxiquinol 類(分子左右のイソプレン単位を欠いている)には強力な血管新生阻害作用が知られており、本化合物の詳細な活性試験が望まれている。我々はこれまでの研究成果として二量化反応前駆体である cytosporin D の全合成について 2016 年度の本大会で発表しているが、初期段階の工程数の長さや終盤の工程における収率の低さが原因で、pestaloquinol 類の全合成に向けた最終段階である cytosporin D の酸化的二量化反応を検討するに至らなかった。そこで我々は合成スキームを抜本的に見直し、更に効率的な合成法の確立を目指すことにした。



【方法・結果】 まずは合成ルートの確立を目指し、ラセミ体での全合成を試みることにした。新たな出発物質として文献既知の 3-TBSoxy-2,2-dimethylcyclopentan-1-one (**4**)を設定し、３工程の変換を経てジエン **5** へと導いた。なお **4** は 90%ee 以上の光学純度で合成可能であることが既に知られている [2]。その後 **5** とアクロレインとの Diels-Alder 反応を含む 6 工程にて重要中間体であるエポキシケトン **6** を調製した。現在は **6** のケトンα位への炭素鎖の導入とその後の脱保護および酸化度の調整による **7** の合成を検討中であり、本大会ではこれまでの検討の詳細について報告する予定である。



1) *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 286-291.; 2) *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6354-6357.

polyketide, meroterpene, cytotoxic

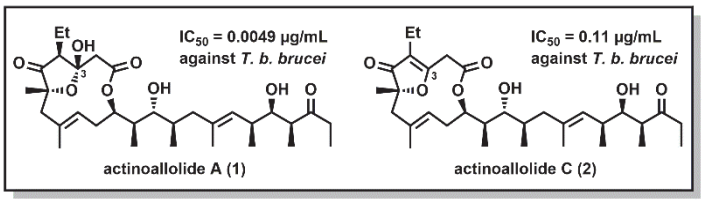
発表責任者：小倉由資（ysk.ogura@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A16a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A16 会場

抗トリパノソーマ活性を有する actinoallolide A の合成研究

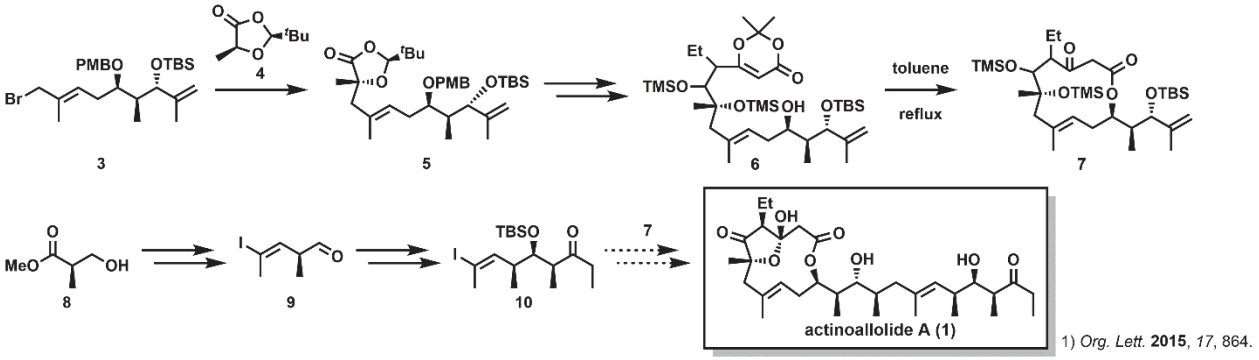
Synthetic studies on the anti-trypanosomal macrolide actinoallolide A

○十和田 諒、桑原 重文（東北大院農）
○Ryo Towada, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)



【緒言】　Actinoallolide A (**1**)は北里研究所の大村らにより、希少放線菌から単離された 12 員環マクロライドであり、極めて強力な抗トリパノソーマ活性を有する [1]。Actinoallolide の名を冠する化合物は 5 種類存在するが、そのなかで最も強力な抗トリパノソーマ活性を有する **1** は各種病因原虫に対して既存の治療薬に匹敵する活性を示すことに加えて細胞毒性も無いことから、安全性の高い抗トリパノソーマ治療薬リード化合物として期待されている。しかし 3 位水酸基の脱水を引き起こしやすく、脱水体である **2** の活性は大幅に減弱することから、薬剤としての安定性には問題が残る。一方有機合成化学的観点から見ると、5 員環ヘミアセタール構造を内包した 12 員環マクロラクトン構造を有する **1** は興味深い化合物である。このように、生物学的および有機合成化学的にも魅力的な本化合物の全合成を達成し、構造活性相関研究へと展開することを意図して本合成研究に着手した。

【方法・結果】　**1** を合成するにあたり、左右のセグメントをカップリング反応により連結する収束的な合成経路を立案した。まず、光学活性なアリル型臭化物 **3** を Seebach ラクトン **4** とのアルキル化に付すことで不斉四置換炭素を高立体選択的に構築して **5** とし、数工程の変換で環化前駆体 **6** へ導いた。これをトルエン溶媒中、高希釈条件下加熱還流することで効率的に 12 員環ラクトン構造を有する左側セグメント **7** の調製を完了した。一方 **8** より数工程でヨードアルケン **9** を調製し、アルドール反応および第二級水酸基の TBS 保護で右側セグメント **10** を合成した。今後は両セグメントのカップリングおよび 5 員環ヘミアセタール構造の構築により **1** の全合成を達成する予定である。



1) *Org. Lett.* **2015**, *17*, 864.

anti-trypanosomal macrolide, diastereoselective synthesis, lactonization

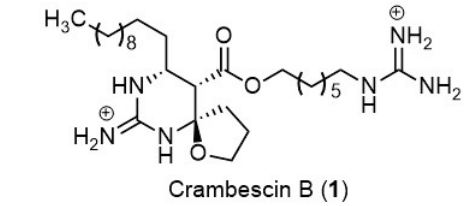
講演番号：3A16a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A16 会場

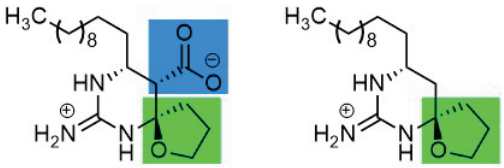
クランベシン類縁体の合成研究

Synthetic studies on Crambescin analogues

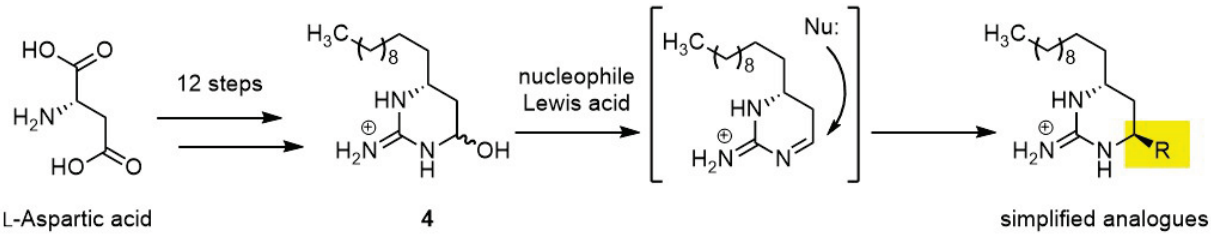
○毛利 春輔、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Shunsuke MOURI, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

グアニジン含有化合物は自然界に数多く存在し、その特徴的な生理活性から医薬品への応用が期待されている。クランベシン類は地中海に生息する海綿 *Crambe crambe* から単離された環状グアニジンアルカロイドである[1,2]。当研究室では、クランベシン B (**1**)のグアニジン側鎖が欠落したクランベシン B カルボン酸(**2**)及び脱炭酸体(**3**)の不斉合成を達成した[3]。これらの化合物は Neuro 2A 細胞を用いたアッセイ系にて電位依存性 Na^+チャネル（Na_v）に対して強い阻害活性を示すことが判明した[3]。また、電気生理学的手法により、**2** は局所麻酔薬に類似するメカニズムによってこの強い阻害活性を持つことが推測された[4]。今回我々は、これらの知見を活かした優れた局所麻酔薬の創成を目指し、クランベシン B カルボン酸のさらなる単純化類縁体として、テトラヒドロフラン環の代わりに種々の官能基を導入した化合物群の合成法を確立したので報告する。





L-アスパラギン酸を出発原料として、無保護の環状グアニジンヘミアミナール **4** を 12 段階で合成した。**4** に対し、Lewis 酸共存下で求核剤を作用させることで、様々な官能基の立体選択的な導入が可能となった。本手法は合成の終盤に各種置換基を導入できることから、構造活性相関研究に向けた誘導体合成に適している。本発表では、**4** の合成法及び官能基導入の検討に関する詳細を述べる。



References

1. Braekman, J. C. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6531. 2. Braekman, J. C. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 528. 3. Nishikawa, T. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304. 4. Tsukamoto, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1247.

guanidine, analogue synthesis, structure-activity relationship (SAR)

発表責任者：毛利春輔（mouri.shunsuke@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

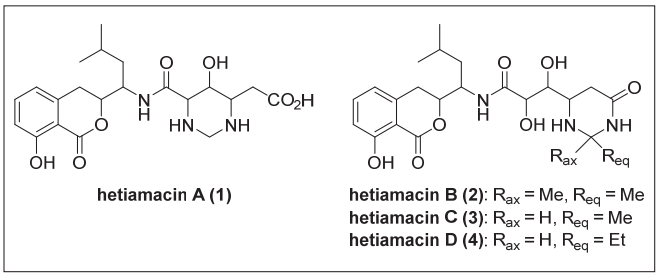
講演番号：3A16a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A16 会場

Hetiamacin 類の合成研究

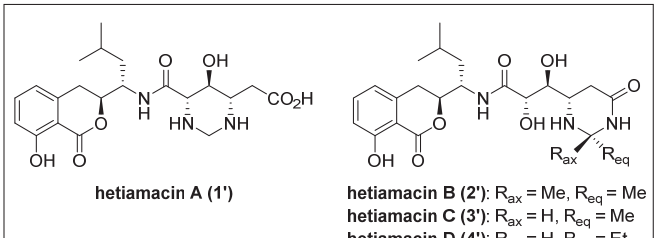
Synthetic studies on Hetiamacins

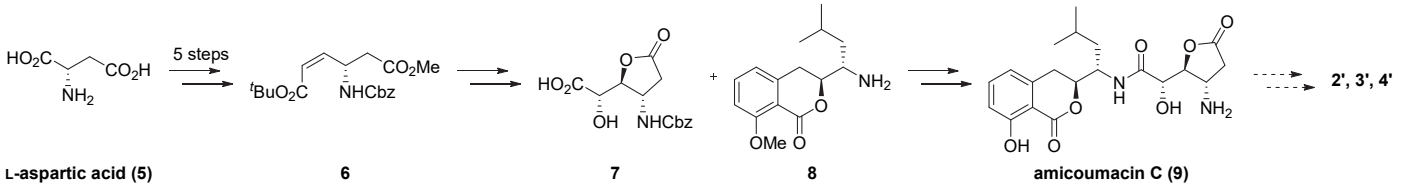
○塚口 頌悟、十和田 諒、倉沢 一輝、小倉 由資、榎本 賢、桑原 重文（東北大農）
○ Shogo Tsukaguchi, Ryo Towada, Kazuki Kurasawa, Yusuke Ogura, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara (Tohoku univ.)

【目的】hetiamacin A (**1**)は 2013 年に、hetiamacin B (**2**)~D (**4**)は 2016 年に Liu らによって、*B. subtilis* PJS から単離された新規アミクマシン型天然物であり、**1** は HeLa 細胞に対する細胞毒性、**2** はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を有する[1,2]。これら hetiamacin 類は、アミクマシン型天然物に共通するジヒドロイソクマリン構造と異常アミノ酸とがアミド結合で連結した構造を有し、特に **1** はヘキサヒドロピリミジン環、**2~4** はテトラヒドロ-4-ピリミジノン環という天然物には珍しい構造を含んでいるが、hetiamacin 類の絶対立体配置と相対立体配置（一部を除く）は未決定である[1,2]。そこで本研究では hetiamacin 類の初の全合成と立体化学の決定を目的とし研究に着手した。



【方法･結果】これまでに報告されてきたアミクマシン型天然物の立体化学と単離文献の NMR データの解析により、hetiamacin A~D の絶対立体配置をそれぞれ **1'~4'** と予想した。**2'~4'** は類縁体である amicoumacin C (**9**) (下図)に対して官能基変換を行えば合成できると考え、まず効率的な **9** の調製を行い **2'~4'**の合成を目指すこととした。出発原料である L-aspartic acid (**5**)から 5 工程で *Z*-オレフィン **6** を調製し、四酸化オスミウムによるジオール化と *t*-Bu 基の除去により **7** へと導いた。**7** と既知アミン **8**[3] との縮合と脱保護により **9** を調製した。現在アンモニアによる **9** の五員環ラクトンの開裂と *N*,*N*-アセタール形成による **2'~4'**の全合成を進めている。また **1'**についても本合成経路に基づいて合成を行う予定である。





1) Liu, S. *et al*., *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 281. 2) Liu, S. *et al*., *J. Antibiot.* **2016**, *69*, 769. 3) Suzuki, T., Kuwahara, S. *et al*, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1992.

amicoumacin, structural determination, total synthesis

講演番号：3A16a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A16 会場

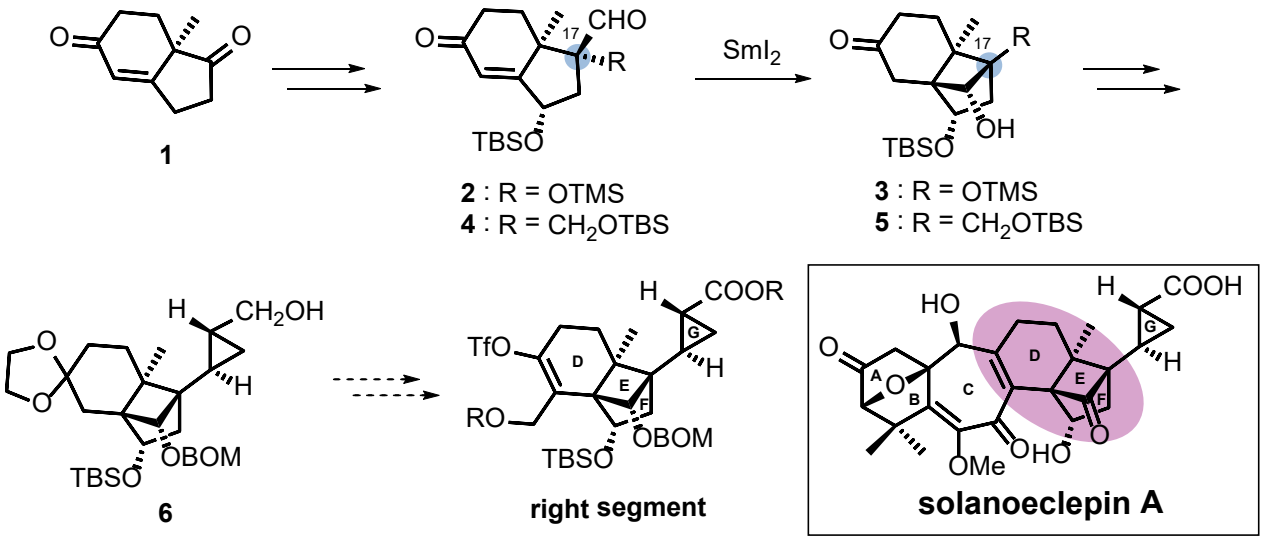
ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A の右側部分の合成研究

Synthetic Studies on Right Segment of Solanoeclepin A, a Hatching Agent of Potato Cyst Nematode

○幸木 謙典、宮澤 悠、駒田 武馬、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Kensuke KOUKI, Yu MIYAZAWA, Takema KOMADA, Masaatsu ADACHI, Toshio NISIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】ソラノエクレピン A は、ジャガイモ水耕栽培液から単離されたジャガイモシスト線虫の孵化促進物質であり、農薬のリード化合物として注目されている。本研究では、ソラノエクレピン A の全合成と未だ不明な構造活性相関の解明を目的として、高度に歪んだシクロブタンを含む右側セグメントの合成を検討した。

【方法および結果】多官能基化されたトリシクロデカン骨格の構築は、ソラノエクレピン A の合成における課題の 1 つである。当研究室では、光学活性な Hajos-Parrish ケトン **1** から誘導したアルデヒド **2** に対するヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応によって、シクロブタン構築を鍵とするトリシクロデカン **3** の合成に成功している [1),2)]。今回、化合物 **1** から天然物の 17 位に相当する位置に側鎖を導入したアルデヒド **4** を合成し、本手法を適用した結果、期待通り反応は速やかに進行し、トリシクロデカン **5** を収率良く合成することに成功した。続いて、シクロプロパン化を含む変換反応を経て、**6** を合成した。現在、右側セグメントの合成に向けて、D 環への官能基導入を検討中である。



1）Komada, T.; Adachi, M.; Nishikawa, T. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 287.
2）宮澤　悠、駒田武馬、安立昌篤、西川俊夫、日本農芸化学会２０１６年度大会（札幌）、2B093.

solanoeclepin A, radical cyclization, cyclobutane

講演番号：3A16a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A16 会場

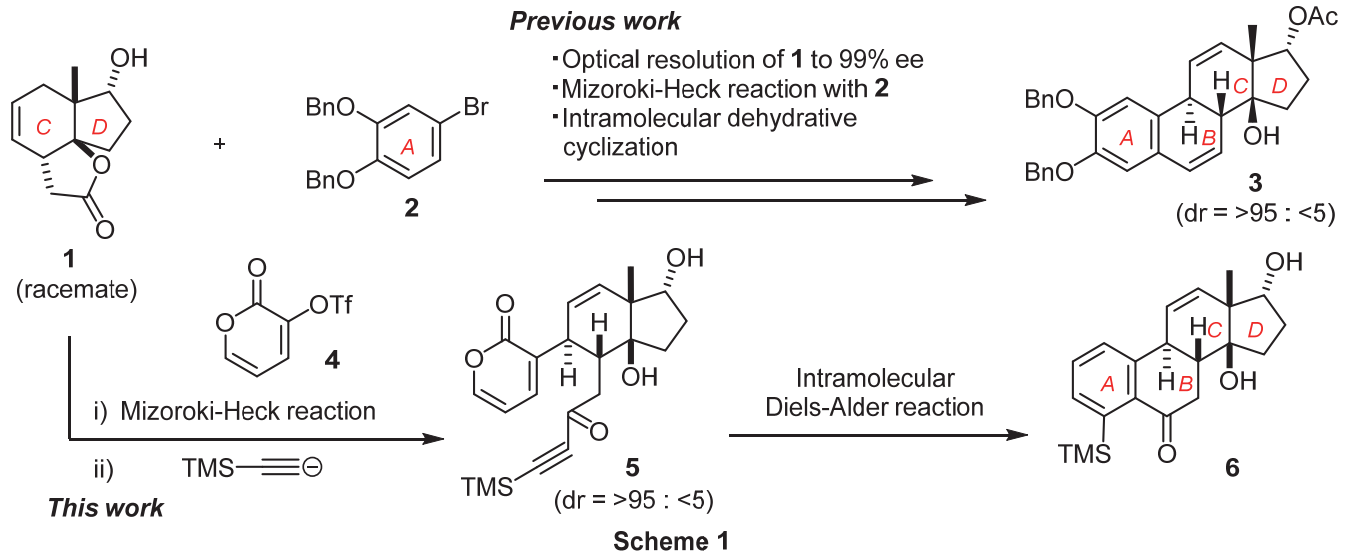
分子内 Diels-Alder 反応を利用したステロイド骨格の新規構築法の開発

Development of a new synthetic method for steroidal skeleton using intramolecular Diels-Alder reaction

○渡邉 正悟、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Shogo Watanabe, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa (Nagoya Univ.)

【背景と目的】ステロイドには多様な類縁体が存在し、強力な生物活性を有することから古くから注目されている。合成化学的には、複数の不斉炭素を立体制御しつつ骨格構築することが肝要であり、これまでに多くの優れた合成方法が報告されている [1]。当研究室では、多様な類縁体の獲得を可能とする汎用性の高い合成法の開発に着手しており、これまでに、溝呂木-Heck 反応と分子内脱水環化による 2,14-ジヒドロキシエストラジオール誘導体 **3** の合成に成功している(Scheme 1)[2,3]。この方法で得られる **3** は、BCD 環に官能基化の足掛かりを有する汎用性の高い中間体である。本研究の一環として、今回我々は分子内 Diels-Alder 反応を利用したステロイド骨格の新規構築法を開発したので報告する。

【方法と結果】A 環の構築には、置換ベンゼンの合成に有用なα-ピロン誘導体を用いることとした。CD 環 **1** とα-ピロン **4** を用いた溝呂木-Heck 反応とそれに続くγ-ラクトンの開環によりイノン **5** を立体選択的に合成した後に、分子内 Diels-Alder 反応によりベンゼン環を有する中間体 **6** を合成した。これにより得られる **6** の BCD 環には、それぞれケトン、アルケン、ヒドロキシ基といった足掛かりとなる官能基を有することから、多様な類縁体合成が可能であると期待される。



Scheme 1

【参考文献】1. Santelli, M. *et al*. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11511.
2. 橋本ら 日本農芸化学会 2017 年度大会, 4C12a03.
3. Hashimoto, K. *et al. J. Org. Chem.* **2017**. *82*. 9097.

steroidal skeleton, Mizoroki-Heck reaction, intramolecular Diels-Alder reaction

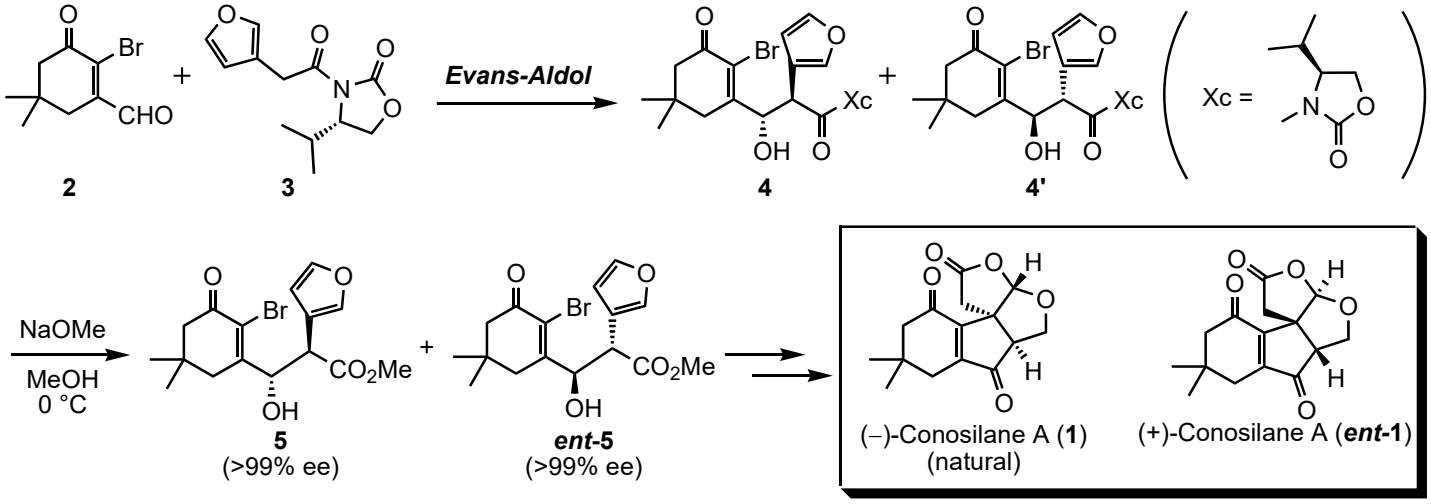
講演番号：3A16a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A16 会場

Conosilane A の両鏡像体の全合成
Total synthesis of both enantiomers of Conosilane A

○岡村 仁則、森 直紀、渡邉 秀典（東大院・農生科）
○Hironori OKAMURA, Naoki MORI, Hidenori WATANABE (The University of Tokyo)

Conosilane A (**1**) は、オキナタケ科のキノコの一種である *Conocybe siliginea* の培養液より 2012 年に単離されたセスキテルペンである [1]。本化合物は 11β-HSD1 という、生活習慣病型疾患の関連因子であると示唆されている酵素に対し中程度の阻害活性を有している。前年度大会において我々は本化合物のラセミ体全合成を報告した [2]。今回、本化合物の両光学活性体の全合成を達成したので報告する。

アルデヒド **2** と光学活性なオキサゾリジノン **3** との *anti* 型 Evans アルドール反応 [3] を適用した結果、望むエナンチオ選択性は発現しなかったもののジアステレオ選択的なアルドール成績体 **4** 及び **4'** を混合物として得た。これらを分離し不斉補助基を除去して光学活性なβ-ヒドロキシエステル **5** 及び ***ent*-5** へと導いた。その後、ラセミ体合成時の手法に改良を加えつつ合成を進め、Conosilane A の両光学活性体の全合成を達成した。合成品の比旋光度を比較した結果、単離グループによって報告された絶対立体配置が正しいものであることを確認した。



1) Xiao-Yan Yang, Tao Feng, Zheng-Hui Li, Yu Sheng, Xia Yin, Ying Leng, Ji-Kai Liu, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5382.
2) 岡村仁則、渡邉秀典、日本農芸化学会 2017 年度大会(京都)
3) David A. Evans, Jason S. Tedrow, Jared T. Shaw, and C. Wade Downey, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 392

total synthesis, asymmetric synthesis, sesquiterpene

講演番号：3A16a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A16 会場

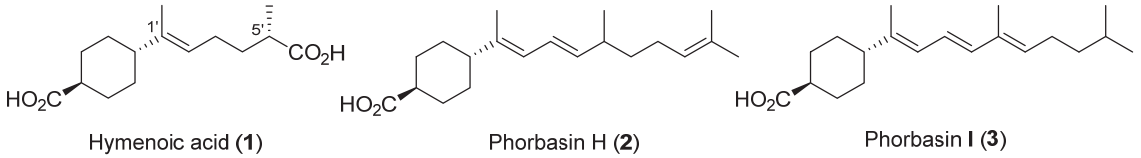
Hymenoic acid 及びその類縁体の合成研究

Synthetic studies of hymenoic acid and its relatives.

○髙橋 健輔、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院・農）
○Kensuke TAKAHASHI, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

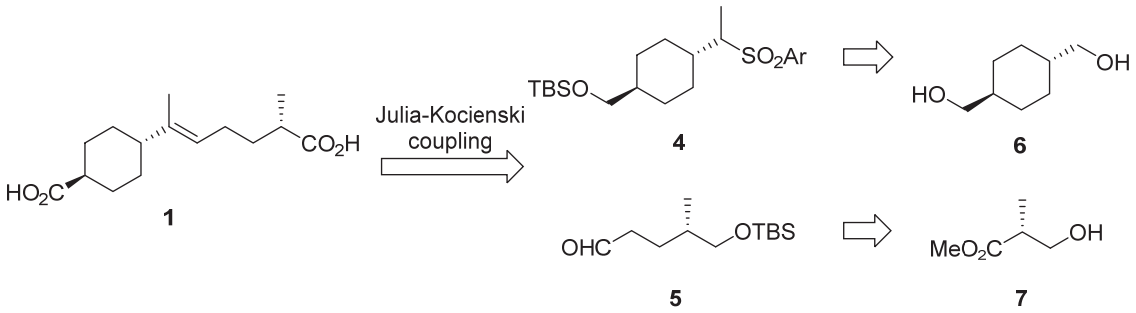
【目的】

Hymenoic acid (**1**) は 2008 年に Nishida らによって、八丈島に生息するサンゴに寄生する真菌から単離されたセスキテルペンである [1)]。Hymenoic acid (**1**) はヒト DNA ポリメラーゼλに対して特異的な阻害活性を示す。同様の特異的な阻害活性を持つ物質は、抗炎症作用を持つことが報告されており、医薬品としての応用が期待できる。我々は、hymenoic acid (**1**) の全合成を達成した。さらに、hymenoic acid (**1**) と同様の部分構造を有する phorbasin H (**2**) と phorbasin I (**3**) [2)]の合成を目的としている。



【方法・結果】

Hymenoic acid (1) の 1'-位にトランスのオレフィンを持つ骨格は、Julia-Kocienski カップリングを用いて形成できると考え合成に着手し、目的化合物の合成を達成した。また、Julia-Kocienski カップリングを用いた、hymenoic acid (**1**) の類縁体の合成を目指している。



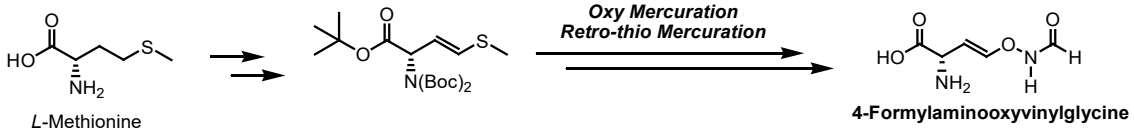
1) M. Nishida, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 5115-5122.
2) H. Lee, *et al., Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, *56,* 1198-1200.

sesquiterpene, Julia-Kocienski olefination, dicarboxylic acid

講演番号：3A16a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A16 会場

新規反応を用いたオキシビニルグリシン類類縁体の全合成研究
Synthesis of oxyvinylglycine varients enabled by oxymercuration
○前田 大輝、堀之内 妙子、森 直紀、渡邉 秀典（東大院・農・応生科）
○Hiroki MAEDA, Taeko HORINOUCHI, Naoki MORI, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

【目的】ビニルグリシン類はピリドキサールリン酸依存性酵素の阻害剤として作用することが知られており、多様な生理活性作用を示す。Formylaminooxyvinylglycine (FVG)は土壌細菌である *Pseudomonas fluorescenece* WH6 より 2010 年に単離されたアミノ酸であり、スズメノカタビラ (*Poa annua* L.)の種子の発芽を不可逆的に停止する作用を有することが報告されている。本化合物の合成を行う上で、アミノオキシビニル構造の構築方法が課題であった。我々は、天然物化学的に興味深い構造を有する本化合物の初の全合成を目指すとともに、更なる生化学の発展と実用化につながることを期待し、本化合物とその誘導体の合成に着手した。
【方法と結果】メチオニン誘導体に対して、水銀を用いた酸素官能基の導入と二重結合の再生を一挙に行う、新規合成法を用いることにより、FVG の基本骨格の構築を行い、本化合物の全合成を達成したので報告する。現在、構造活性相関研究を見据えた FVG 誘導体の合成研究、本新規合成法を用いた他のオキシビニルグリシン類の合成についても併せて報告したい。



L-Methionine　　**4-Formylaminooxyvinylglycine**

Organic chemistry, Total synthesis, Natural product

発表責任者：前田大輝（pgea0128@gmail.com）

講演番号：3A16a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A16 会場

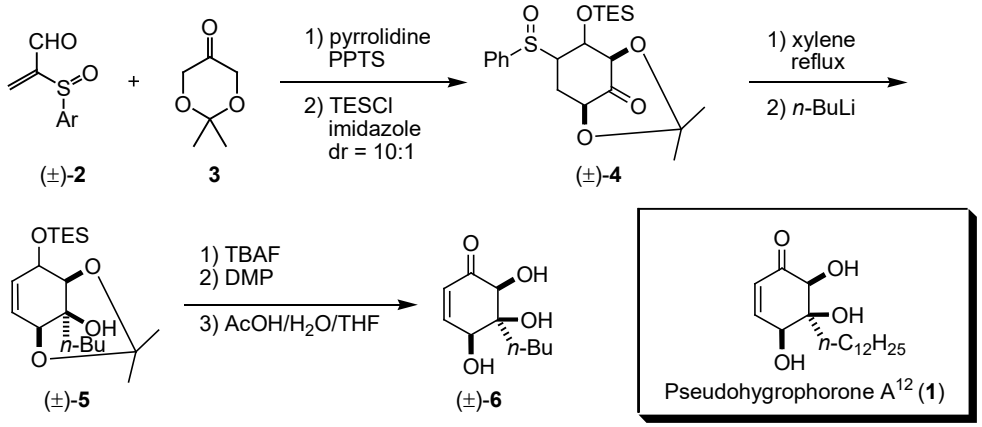
抗植物病原菌活性を示す PseudohygrophoroneA[12] の合成研究

Synthetic Study of Pseudohygrophorone A[12]

○山本 優月、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Yuzuki YAMAMOTO, Hidenori WATANABE (The University of Tokyo)

【目的】Pseudohygrophorone A[12](**1**)はヌメリガサ科に属するキノコ *Hygrophorus abieticola* の子実体より単離・構造決定されたポリケチドであり、植物病原菌に対する抗菌活性を有することが報告されている。我々は作用機序の解明及び構造活性相関研究のための試料供給を目的として Pseudohygrophorone A[12](**1**)の合成研究に着手した。

【方法と結果】文献既知のケトン **3** に対して不飽和アルデヒド **2** を作用させることで Michael 付加反応及び続く Aldol 反応を行い、10:1 のジアステレオマー比で環化体 **4** を得た。得られた **4** に対してスルホキシドの脱離を行い、側鎖の短いモデル実験として *n*-BuLi の付加反応を行い、付加体 **5** を単一ジアステレオマーとして得た。**5** に対して TES 基除去、水酸基の酸化、アセトニドの除去、の 3 工程の変換を施すことで **6** を得た。モデル化合物 **6** における 6 員環部分の ^{1}H-NMR スペクトルは天然物 **1** の文献値と良好な相同性を示しており、立体選択的な合成ルートを確立することができたため報告する。



【今後の展望】
中間体 **4** に対して炭素数 12 のアルキル鎖を導入し、上記と同様の変換を経ることで **1** の全合成が達成できるものと考えている。また、現時点で高光学純度の **2** を調製し、光学活性体合成をおこなっている。なお、環化反応の際にキラルなアミンを用いることで立体選択性ならびに収率の向上も検討する予定である。

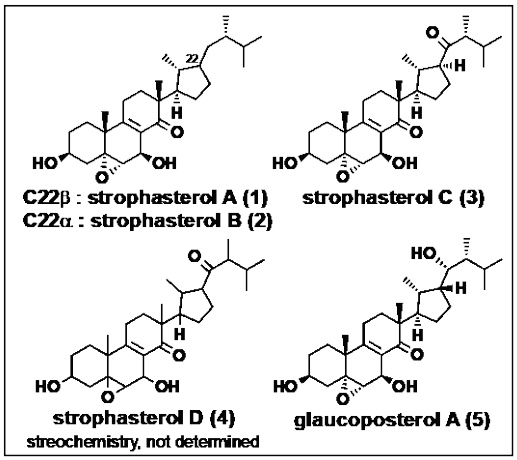
Polyketide, Natural Product

講演番号：3A16a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A16 会場

strophasterol C, D 及び glaucoposterol A の合成研究

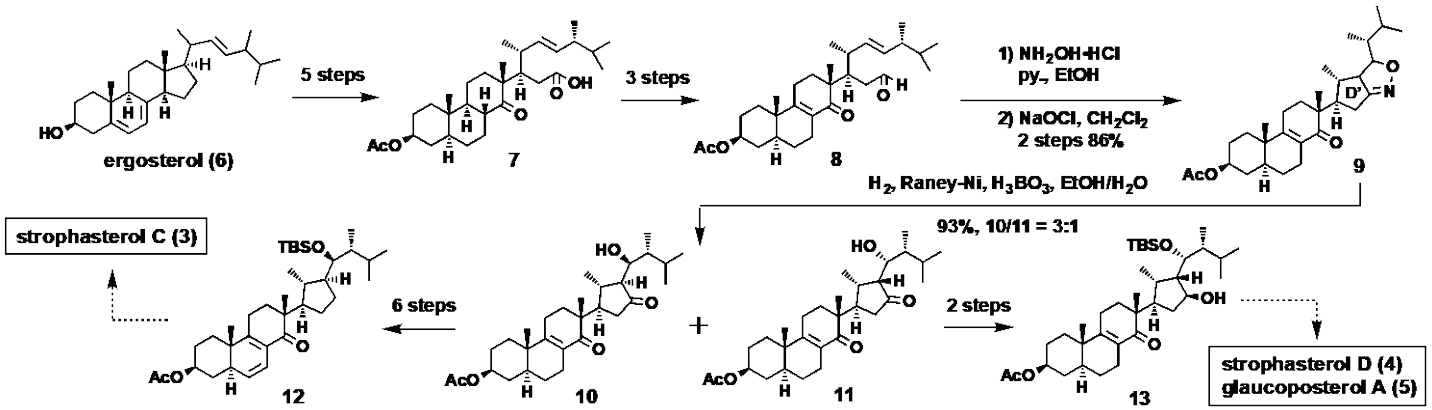
Synthetic studies on strophasterols C, D and glaucoposterol A

○佐藤 俊太郎、福田 裕紀、小倉 由資、桑原 重文（東北大農）
○Shuntaro Sato, Yuki Fukuda, Yusuke Ogura, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)



【背景】 Strophasterol A-D (**1-4**)は 2012 年にサケツバタケ(*Stropharia rugosoannulata*)から、glaucoposterol A (**5**)は 2017 年にアオアシフウセンタケ(*Cortinarius glacopus*)から単離された新規ステロイド誘導体である [1,2,3]。**1** はキノコ子実体形成誘導活性を示し、分類学的に異なる 82 種類のキノコにおける内在が確認されたことから、世界初のキノコホルモンである可能性が示唆されている(**2-5** の生物活性は不明)。未だ全合成が達成されていない **3-5** の量的供給を実現し、詳細な活性評価を行うことを目的として合成研究に着手した。

【方法・結果】 昨年度大会で我々は **1** 及び **2** の全合成を報告した。今回はその際合成したカルボン酸 **7** を出発物質として、**3-5** の網羅的な全合成を目指した。まず、ergosterol から 5 工程の変換で得られる **7** をアルデヒド **8** へと導いた。**8** を対応するオキシムへと変換後、ニトリルオキシドの分子内 1,3-双極子環化付加反応により D'環の構築と側鎖への酸素官能基の導入を一挙に行い **9** とした。オキサゾリン環を開裂して得た **10** 及び **11** を分離後、**10** は 6 工程を経て **3** の中間体である **12** へ、**11** は 2 工程を経て **4**, **5** の中間体である **13** へ導くことに成功した。



1) H. Kawagishi, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10820. 2) J. Wu *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 1779. 3) H. T. Aung, *et al.*, *Chem. Biodiversity* **2017**, *14*, e1600421.

strophasterol, total synthesis, mushroom

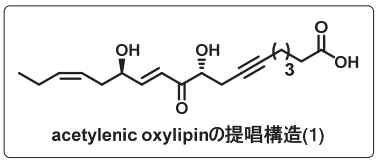
講演番号：3A16a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A16 会場

三重結合を有するオキシリピン型天然物の全合成と構造の訂正

Total synthesis and structural revision of acetylenic oxylipin natural product

○添田 博樹、十和田 諒、小倉 由資、桑原 重文（東北大農）
○Hiroki Soeda, Ryo Towada, Yusuke Ogura, Shigehumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

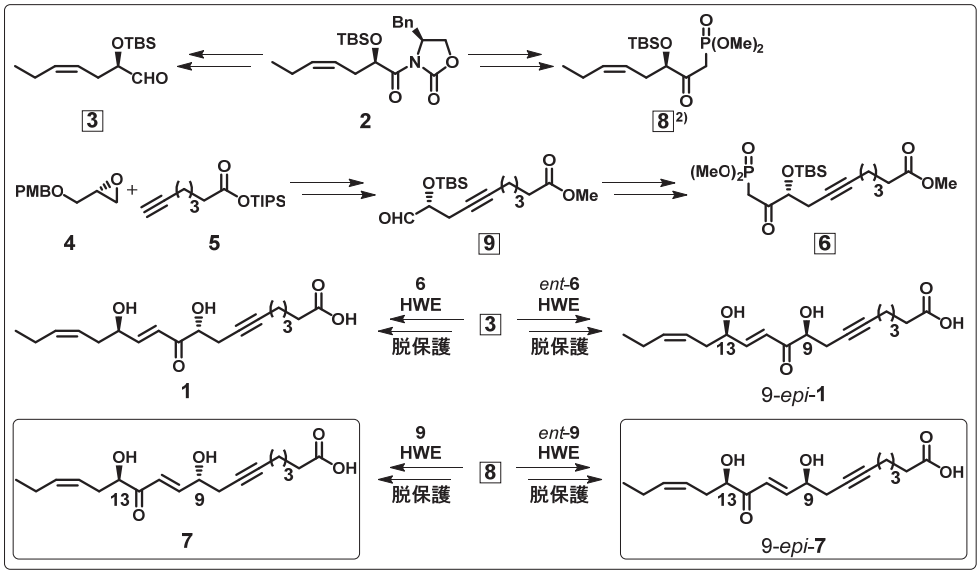
【目的】**1** は 2010 年に Pohnert らによりカモジゴケ(*Dicranum scoparium*)から単離された、三重結合を有するオキシリピン型天然物の提唱構造である [1]。同時に単離されたオキシリピンの数種の混合物は、ナメクジに対する摂食阻害活性を示すが、**1** のみの生物活性は知られていない。本研究では **1** の全合成及び活性試験に供することを目的とした。



acetylenic oxylipinの提唱構造(1)

【方法・結果】 既知化合物である **2** より数工程の変換でアルデヒド **3** を得た。また、**4** と **5** を連結し中間体 **9** を経由してホスホネート **6** を調製した。**3** と **6** を HWE 反応で *E* 選択的に連結し、脱保護をすることで提唱構造 **(1)**を合成したが、その各種スペクトルは天然物と一致しなかった。水酸基の立体化学の違いが原因であると考え、*ent*-**6** を用いて 9,13-シン体である 9-*epi*-**1** を合成したが、これも天然物とスペクトルが一致しなかった。そこで単離文献に記載された各種データを精査したところ、天然物の真の構造として 9,13-アンチ体である **7** 又は 9,13-シン体である 9-*epi*-**7** の構造が示唆された。

8 と **9** 及び *ent*-**9** を用いて両者を合成したところ、ともに天然物とほぼ一致した NMR スペクトルを与えたが、完全に一致はしなかった。詳細な NMR 解析より、天然物は両者の混合物であることが示唆され、その混合物を調製しスペクトルを測定したところ、^{1}H NMR は天然物と一致し、天然物が **7** と 9-*epi*-**7** の混合物であることが強く示唆された。



1) G. Pohnert *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4755-4758.
2) Mohri, Ogura, Towada, Kuwahara, *Tetrahedron Letters*. **2017**, *58*, 4011–4013.

bioorganic chemistry, total synthesis, acretylenic oxylipin

講演番号：3A16a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A16 会場

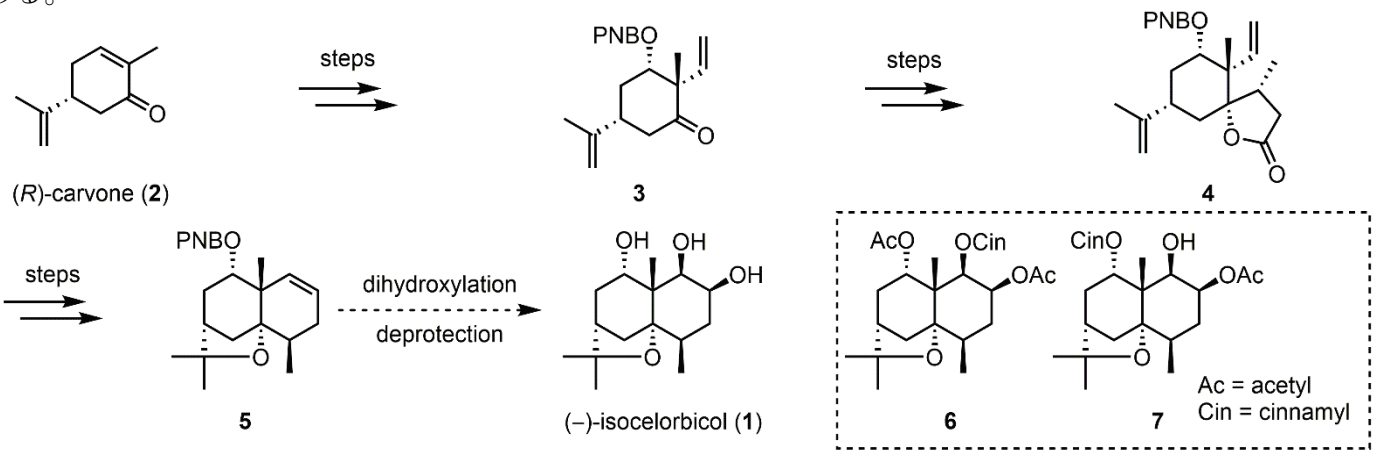
(-)-isocelorbicol の合成研究

Synthetic study of (-)-isocelorbicol

○毛利 朋世、高橋 祐介、桑原 重文、小倉 由資（東北大農）
○Tomoyo MOHRI, Yusuke TAKAHASHI, Shigefumi KUWAHARA, Yusuke OGURA (Tohoku Univ.)

【目的】(-)-isocelorbicol (**1**)は 1976 年に Smith らによってニシキギ科の植物 *Celastrus orbiculatus* より単離・構造決定されたジヒドロ-*β*-アガロフラン骨格を有するセスキテルペンであり、2 つの四級炭素を含む 7 つの不斉点を有する [1]。本化合物の生物活性は不明であるが、その水酸基が修飾された同骨格を有する天然物は、**6** がヒト HL-60 細胞に対する阻害活性、**7** が EB ウイルスに対する阻害活性を示すなど、多種多様な生物活性を有する [2), 3)]。したがって(-)-isocelorbicol (**1**)の全合成は **6** や **7** を代表例とする類似天然物や他の *β*-アガロフラン骨格を有する天然物を合成する起点となり得ることから意義深いと言える。現在までに **1** の合成は数例報告されているが、多段階の工程を要する、収率が低い、水酸基やメチル基の立体選択的構築に問題があるなど、改善の余地が残されている。そこで我々は、本化合物の全合成によるジヒドロ-*β*-アガロフラン骨格の高立体選択的かつ効率的合成法の確立を目的として本研究に着手した。

【結果】(*R*)-carvone (**2**)を出発原料としてケトン **3** を高立体選択的に調製し、その後種々の変換を行ってラクトン **4** を得た。さらに *trans*-デカリン環の構築およびエーテル環化を行うことで **1** の全炭素骨格を備えた **5** の調製を完了した。現在は **5** に対する四酸化オスミウムを用いた立体選択的ジヒドロキシ化の条件検討を行っているところである。今後は PNB 基を除去して **1** の全合成を達成する予定である。



1) Smith, C. R. *et al*., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 3264. 2) Zhao, W. *et al*., *J. Nat. Prod*. **2008**, *71*, 1005.
3) Ohshima, S. *et al*., *J. Nat. Prod*. **1993**, *56*, 815.

total synthesis, sesquiterpene, natural products

講演番号：3A16p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A16 会場

ウコンより単離された芳香族ビサボラン型セスキテルペンの合成とその香気特性の解明

Synthesis and sensorial property of the bisabolane sesquiterpene isolated from the genus *Curcuma*

○白川 和泉[1]、矢島 新[2]、勝田 亮[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・生命)
○Izumi SHIRAKAWA[1], Arata YAJIMA[2], Ryo KATSUTA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】1,3,5-Bisabolatrien-7-ol (**1**)はウコン属の植物 *Curcuma amada* より単離された芳香族ビサボラン型セスキテルペンであり、*C. amada* の微量香気成分であると考えられている [1)]。また 7 位に 3 級のヒドロキシ基を有することから、その立体化学と香気特性の相関に興味が持たれた。さらに、天然からは同様に 7 位にヒドロキシ基を有する芳香族ビサボラン型セスキテルペン類が多く見出されており、その中には黒斑病菌に対し抗菌活性を有する peniciaculin A [2)] (**2**)など、興味深い生物活性を有するものも多く存在する(Figure 1)。よって我々は、**1** の立体選択的合成によりその香気特性の解明を目指すとともに、4 級不斉炭素原子を有する芳香族ビサボラン型セスキテルペン類の網羅的合成法を開発することを研究の目的とした。

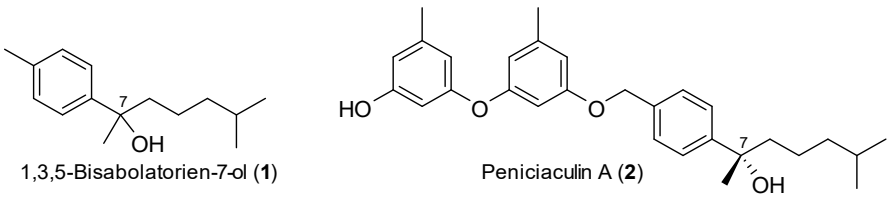


Figure 1. 芳香族ビサボラン型セスキテルペン類の構造

【結果】4'-メチルアセトフェノン(**3**)より合成したアルケン(**4**)に対し、AD-mix を用いた Sharpless 不斉ジヒドロキシ化と Smiles 転位を経て、高立体選択的に 3 級ヒドロキシ基を導入することに成功した。続いて Grubbs 触媒を用いた交差メタセシスによって炭素鎖を伸長した後、最後に接触水素化することで、全 8 工程総収率 13～23%で 1,3,5-bisabolatrien-7-ol (**1**)の両鏡像体の合成を達成した (Figure 2)。この際の鏡像体比は 99:1 以上であった。合成した 1,3,5-bisabolatrien-7-ol (**1**)に対し官能評価を行った結果、この化合物は独特の香気を有し、両鏡像体間で香気の強度に差があることが明らかになった。

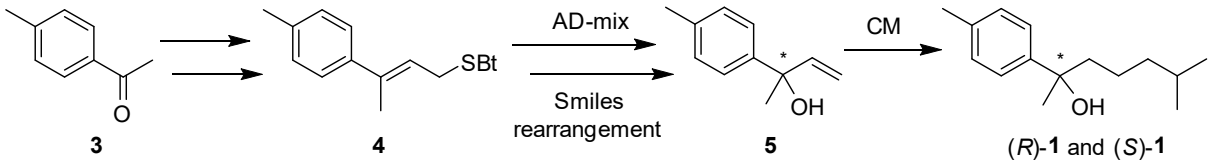


Figure 2 1,3,5-Bisabolatorien-7-ol (**1**) の立体選択的合成

1) Padalia, R. C. *et. al. J. Essent. Oil. Res.* **2013**, *25*, 17-22.
2) Wang, B. *et. al. J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 844-849.

synthesis, 1,3,5-bisabolatrien-7-ol, sensorial property

講演番号：3A16p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A16 会場

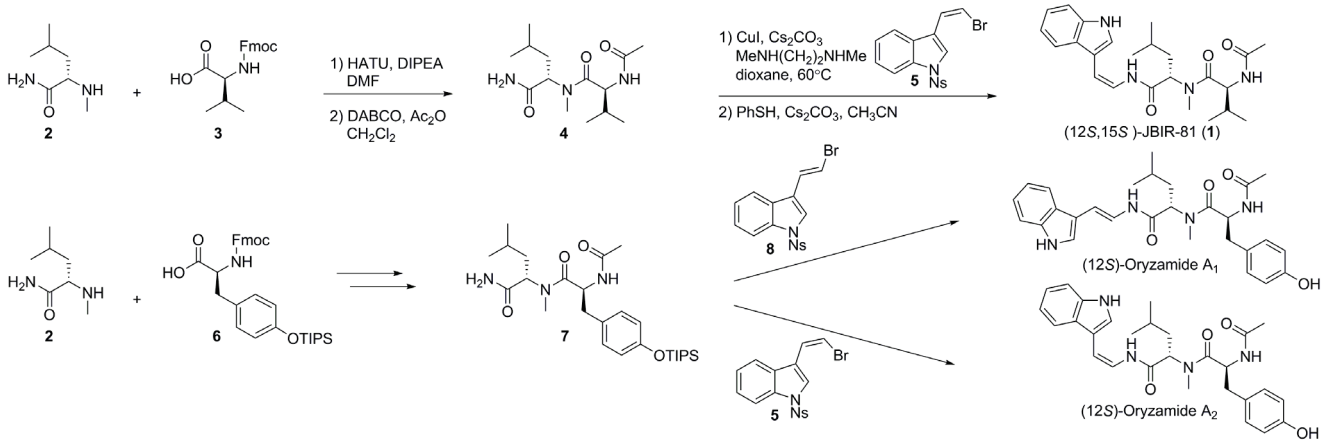
JBIR-81 及び oryzamide A の合成
Synthesis of JBIR-81 and oryzamide A

○豊田 麻実[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大生命)
○Mami Toyoda[1], Ryo Katsuta[2], Arata Yajima[2], Ken Ishigami[2], Tomoo Nukada[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

Aspergillus 属が生産するペプチドエナミドは *N* 末端より *N*-アセチルアミノ酸と *N*-メチルアミノ酸、デヒドロトリプタミンが順次結合した構造を有する。これらの化合物群には細胞周期阻害をはじめとして、多様な生物活性が報告されている。しかし、JBIR-81 や oryzamide 類のように立体化学や生物活性が未解明の類縁体もあり、これらの解明には化学合成が必要である。既存のペプチドエナミド類の合成において、①アミノ酸残基のエピメリ化の抑制、②エナミド部位の幾何異性の制御、③短段階での合成が課題となっていることから、筆者らはこれらの課題を解決するペプチドエナミド類の網羅的合成法の確立を目指した。

本化合物群の網羅的合成経路開拓の嚆矢として、細胞内の L-グルタミン酸毒性に対する保護活性を示す(12*S*,15*S*)-JBIR-81(**1**)を標的化合物とした。アミノ酸の縮合においては *N*-MeLeu-NH_2 (**2**)と *N*-Fmoc-Val (**3**)を用いることにより、エピメリ化の抑制に成功した。また、エナミド部分はアミド **4** と臭化ビニル **5** の銅触媒によるカップリング反応により構築することとし、ジオキサン溶媒中 60℃で反応を行うことで選択的に(*Z*)-エナミドを合成した。最後にインドール窒素の保護基を除去することにより(12*S*,15*S*)-JBIR-81 の合成を 6 工程、総収率 66%で達成した。また *ent*-**3** を用いて(12*S*,15*R*)-体を合成した。続いて、開発した合成法を利用して oryzamide 類の合成を試みた。*N*-MeLeu-NH_2 と *N*-Fmoc-Tyr(TIPS)-OH (**6**)からジペプチド(**7**)を調製し、(*Z*)-および(*E*)-臭化ビニルとそれぞれ縮合することにより(12*S*)-oryzamide A_1 および A_2 を合成した。このように本研究では、ペプチドエナミド類の簡便で効率的な合成法を開発することができた。

また、天然物と合成した JBIR-81、oryzamide A_1 および立体異性体の NMR データを比較したところ、これら天然物の立体化学は下図に示すとおり L-型アミノ酸に由来することが明らかになった。



total synthesis, peptide, Aspergillus

講演番号：3A16p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A16 会場

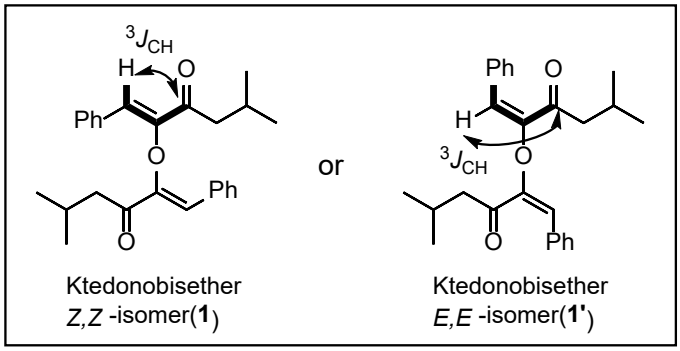
有機合成化学的手法による ktedonobisether の幾何異性解明研究

Elucidation of the geometrical structure of ktedonobisether through synthesis

○齋藤 克哉[1]、春成 円十朗[2]、五十嵐 康弘[2]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大院農、[2]富山県立大工)
○ Katsuya Saito[1], Enjuro Harunari[2], Yasuhiro Igarashi[2], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Toyama Prefectural Univ.)

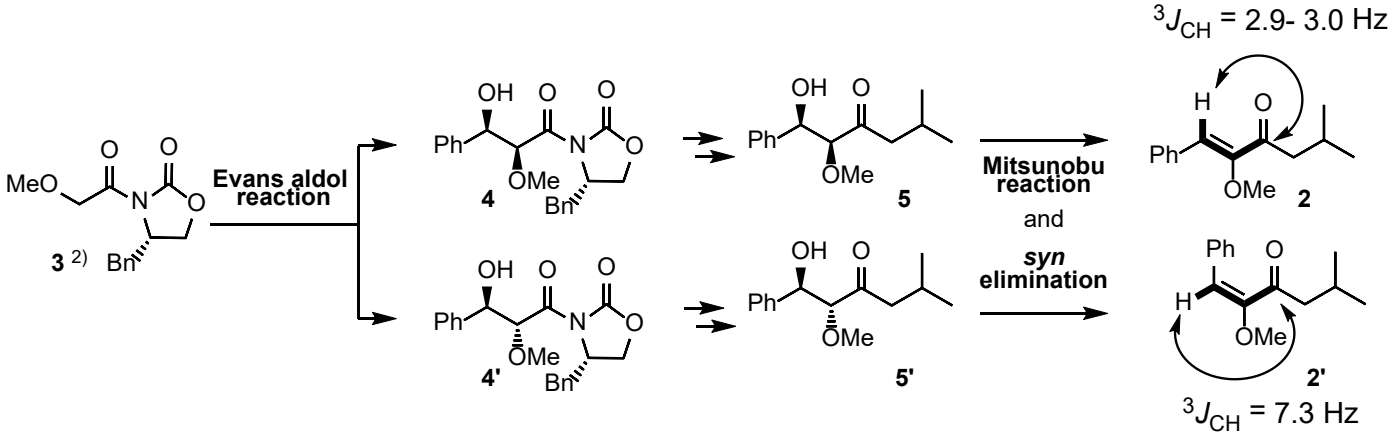
【背景・目的】

Ktedonobisether は Igarashi らによって好熱性細菌 *Thermosporothrix hazakensis* から単離された新規化合物である[1)]。本化合物は構造解析によって、他に類を見ない対称ビスエノールエーテル構造を有する **1** もしくは **1'**であることが示唆された。しかしながら Igarashi らは天然物の高い対称性のため、スペクトル解析のみでは二重結合の幾何異性を決定できなかった。そこで我々は天然物の ^{1}H-^{13}C 遠隔カップリング定数 $^{3}J_{CH}$ に着眼し、以下に示すモデル化合物 **2** 及び **2'**を設計した。すなわち、有機合成化学の手法を用いてモデル化合物を作り分けた後に $^{3}J_{CH}$ カップリング定数を測定し、天然物と比較することで構造決定において強い根拠を示せると考えた。



【方法・結果】

既知物質である **3** に対し、Evans アルドール反応を用いて *syn* 体(**4**)と *anti* 体(**4'**)を作り分けた後、種々の反応を行うことで **5**、**5'**を得た。続いて光延反応を用いてフェニルセレネニル基を導入し、酸化的条件下で *syn* 脱離させることで **2** と **2'**を合成した。**2** 及び **2'**の $^{3}J_{CH}$ カップリング定数を測定したところ、天然物が $^{3}J_{CH}$ = 4.1 Hz であったのに対し、**2** は $^{3}J_{CH}$ = 2.9 -3.0 Hz、**2'**は $^{3}J_{CH}$ = 7.3 Hz となり、ktedonobisether は *Z,Z*-isomer であることが示唆された。現在はモデル化合物の合成経路を踏襲し、diglycolic acid を出発物として、二官能基同時変換戦略により天然物の全合成達成を目指している。



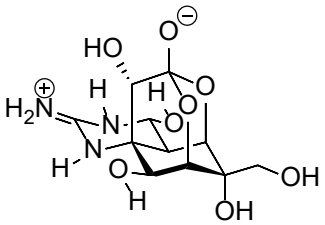
1) Y. Igarashi (private communication) 2) C. Khosla *et al*., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 635.

structure elucidation

講演番号：3A16p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A16 会場

テトロドトキシンのフグ誘引活性の解明を目的とした類縁体の合成研究
Syntheses of Tetrodotoxin Analogs toward Elucidation of Attractive Effect for Puffer Fish
○中東 亮太、安立 昌篤、野口 能寿、山本 直之、阿部 秀樹、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Ryota NAKAHIGASHI, Masaatsu ADACHI, Yoshihisa NOGUCHI, Naoyuki YAMAMOTO, Hideki ABE, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】



Tetrodotoxin (TTX)

フグ中毒の原因物質であるテトロドトキシン(TTX)は、電位依存性ナトリウムチャネルの強力な阻害活性を持つ天然有機化合物である。TTX が強力な毒性を示すことから、フグは TTX を外敵から身を守る防御物質として利用していると考えられている。一方、TTX とフグに関わる興味深い様々な生物現象が報告されてきた。すなわち、クサフグでは TTX を産卵期に集合フェロモンとして利用していることや、フグは TTX に誘引されることなどの報告がある [1),2)]。さらに最近、嗅覚器官である嗅上皮を焼潰したフグは TTX に誘引されないことも報告されている [3)]。我々は TTX によるフグ誘引に興味を持ち、まず TTX によってフグの嗅覚器官が応答するかを電気生理学的手法である嗅電図(EOG)の測定によって検証することにした。あわせて、TTX 関連化合物の EOG 応答を調べることにした。

【方法と結果】

TTX によるフグ誘引作用の構造活性相関を調べるために、フグが保有すると報告されている TTX 類縁体およびその立体異性体の合成を検討した。まず、当研究室で確立された手法でデオキシ TTX を合成した。その合成中間体を足掛かりとして、脱酸素化反応によりジデオキシ TTX およびトリデオキシ TTX、さらにその立体異性体を合成した。現在、調製した高純度の TTX 関連化合物の EOG の測定を検討中である。

References
1) Motohashi, E. *et al. Zool. Sci.* **2010**, *27*, 559.
2) Matsumura, K. *Nature* **1995**, *378*, 563.
3) Okita, K. *et al. Ichthyol. Res.* **2013**, *60*, 386.

EOG：嗅上皮を匂い物質で刺激した時に発生する電場電位変化

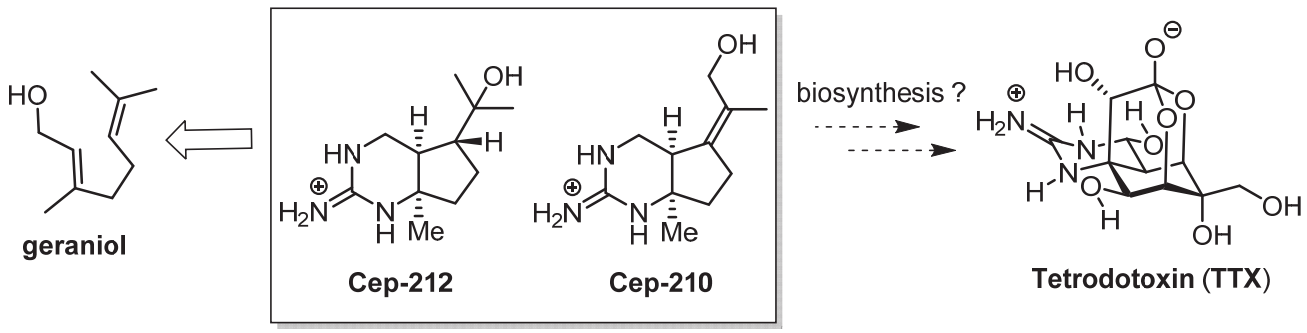
tetrodotoxin, attractive effect, chemical synthesis

講演番号：3A16p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A16 会場

テトロドトキシンの推定生合成中間体の合成研究
Synthetic Studies on Putative Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin
○宮坂 忠親[1]、安立 昌篤[1]、杉本 敬太[2]、山下 まり[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院農)
○Tadachika MIYASAKA[1], Masaatsu ADACHI[1], Keita SUGIMOTO[2], Mari YOTSU-YAMASHITA[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya University, [2]Tohoku University)

【目的】
フグ中毒の原因物質として知られるテトロドトキシン(TTX)は、電位依存性 Na^+チャネルに対する強力な阻害剤である。また、フグだけでなくイモリやカエル、タコなど様々な生物が保有していることが明らかとなっており、TTX の生合成研究の中で様々な TTX 類縁体が発見されたものの、現在もその生合成経路は未解明である。近年、東北大学の山下らは、オキナワシリケンイモリ(*Cynops ensicauda popei*)から環状グアニジン Cep-212 および Cep-210 を単離した[1)]。これら二つの天然物は、その特徴的な構造から TTX の生合成中間体の可能性が指摘されている。しかし、単離された Cep-212 と Cep-210 の量は極僅かであり、また絶対立体配置が未決定である。そこで本研究では、化学合成による量的供給および絶対立体配置の決定を目的として、これらの合成を検討した。

【方法・結果】
ゲラニオールの Sharpless 不斉エポキシ化反応を足掛かりとして、Cep-212 の不斉全合成を達成した。現在、合成品を用いて絶対立体配置の決定および無毒イモリへの投与実験を行っている。また、合成中間体から Cep-210 の合成も検討中である。



Reference
1) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, *55*, 8728.

tetrodotoxin, biosynthesis, chemical synthesis

発表責任者：宮坂忠親（miyasaka.tadachika@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A16p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A16 会場

Stereo-controlable α-amino aryl ketone formation: α-Amino *N*-hydroxysuccinimide ester derivatives as acyl donor for Friedel-Crafts acylation

○Zetryana Puteri Tachrim, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

α-Amino aryl-keto groups formation by utilizing optically active *α*-amino acids give great contribution for synthesis of various biologically active compounds formation. The drawback of exciting method for synthesis of *α*-amino aryl ketone is the loss of *α*-amino acids optical purity during the process. One of reliable method to yield *α*-amino aryl ketone is Friedel–Crafts acylation. Many previous studies that utilize direct acylation into aromatic moiety are focusing on amino acid chloride which is toxic, corrosive and moisture-sensitive acyl donor. Other typical acyl donor of amino acid anhydride is stable but only reactive for electron-rich arene acyl acceptor. *N*-hydroxysuccinimide ester derivatives of *α*-amino acids (*α*-amino acid-OSu) have high storage stability and can facilitate peptide synthesis as a good leaving group in the early 1950s without racemization. Not only selectively react with the amine component, *α*-amino acid-OSu produces fewer side reactions. These great utilities of *α*-amino acid-OSu can be potentially used for direct acylation into arene. Utilization of *N*-trifluoroacetyl (TFA) protected-*α*-amino acid-OSu as a potential acyl donor for Friedel–Crafts acylation into various arenes is examined. The reactivity of TFA-*α*-amino acid-OSu is suitable to undergo the acylation by conventional Friedel–Crafts catalyst of $AlCl_3$. Optically active isoleucine, which has two chiral centers in the molecules, and its diastereomer *allo*-isoleucine are subjected to Friedel–Crafts acylation for checking the chilarity of the TFA-*α*-amino aryl ketone derivatives. Acylated products of all isomers for isoleucine and *allo*-isoleucine derivatives were resulted in good yield and no epimerization at *α*-position was observed for each isomer, which can be directly detected by nuclear magnetic resonance (NMR). Based on these results, TFA-*α*-amino acid-OSu is efficiently preventing the loss of optical purity during the Friedel-Crafts acylations. Other branched-chain and unbranched-chain of TFA-*α*-amino acid-OSu were also subjected to Friedel-Crafts acylations. These TFA-*α*-amino acid-OSu showed high reactivity and resulted in an adequate yield of TFA-*α*-amino aryl-ketone with no racemization. Utilization of TFA-*α*-amino acid-OSu is applicable to be synthesized from various *α*-amino acids and its features as a representative acyl donor can act as a part of the comprehensive future study into exploitation in bio-organic synthesis.

α-Amino aryl-ketone, *N*-Hydroxysuccinimide ester, Friedel-Crafts acylation

講演番号：3A16p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A16 会場

芳香族アミノ酸への光反応性基導入法の検討

Construction of photophore on aromatic amino acid

○橋本 誠、王 磊、橋床 泰之 (北大院農)
○Makoto HASHIMOTO, Lei Wang, Yasuyuki Hashidoko (Hokkaido Univ Grad Sch Agr)

【目的】アミノ酸、ペプチドの機能解析を行なう上で、光反応性α-アミノ酸誘導体を用い、光アフィニティーラベル法を用いるの事が考えられる。芳香族アミノ酸誘導体の場合多くの場合、光反応性基とアミノ酸骨格の骨格を縮合する（不斉）合成法が行なわれてきた。様々な光学分割[1)]や不斉合成[2)]を検討する中で、反応制御の条件設定が厳密であり熟練を要する場合が見受けられた。今回α-位の不斉を考慮せずに光反応性基を導入する事を目的とし、光学活性フェニルアラニン上に光照射によりカルベンを発生する光反応性基トリフルオロメチルジアジリンを導入する合成法の検討を行なった。

【方法・結果】N-Boc-L-Phe(4-I)-OtBu を用い、lithiation に続く trifluoroacetylation により N-Boc-L-Phe(4-Tfa)-OtBu とし、oximation、tosylation により tosyloxime とした。これを我々が見出した matal amide 共存下、液体アンモニア中の室温処理によるによる one-pot diazirine 合成に供した所、α-位のラセミ化が確認された。そこで metal amide 非共存下の加熱処理により、α-位のラセミ化は起こさずに Phe 上に光反応性基トリフルオロメチルジアジリンの構築に成功した[3)]。光アフィニティーラベルにおいて安定同位体との組み合わせは非常に重要であるが、我々が見出した芳香族水素の重水素化トリフロオロメタンスルフォン酸による水素ー重水素交換反応はトリフルオロメチルフェニルジアジリン化合物に適用する事は難しかった[4)]。そこで今回の Phe 上への光反応性基構築反応を重水素化 Phe に適用する事で、重水素化 diazirine-based Phe 誘導体の合成にも成功した。

1) K.Masuda, A.Koizumi, T.Misaka, Y.Hatanaka, K.Abe, T.Tanaka, M.Ishiguro, M.Hashimoto, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*,20,1081(2010). 2) M.Hashimoto, Y.Hatanaka, Y.Sadakane, K.Nabeta, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*,12,2507(2002), H.Nakashima, M.Hashimoto Y.Sadakane, T.Tomohiro, Y.Hatanaka, *J.Am.Chem.Soc.*,128,15092(2006), 3) L.Wang, Y.Murai, T.Yoshida, A.Ishida, K.Masuda, Y.Sakihama, Y.Hashidoko, Y.Hatanaka, M.Hashimoto, *Org.Lett.*,17,616(2015), 4) Y.Murai, L.Wang, K.Masuda, Y.Sakihama, Y.Hashidoko, Y.Hatanaka, M.Hashimoto, *Eur.J.Org.Chem.*,5111(2013), L.Wang, Y.Murai, T.Yoshida, M.Okamoto, K.Masuda, Y.Sakihama, Y.Hashidoko, Y.Hatanaka, M.Hashimoto, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*,78,1129(2014), M.Hashimoto, Y.Murai, *J.Syn.Org.Chem.Jpn.*,72,360(2014),Y.Murai, L.Wang, M.Hashimoto, In:Y.Hatanaka, M.Hashimoto (eds) Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein. Springer,pp.111(2017)

Photoaffinity label, Diazirine, Amino acid

発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A16p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A16 会場

円偏光発光特性を示す光学活性オリゴナフトフランの簡便合成

Synthesis and circularly polarized luminescence of optically active oligonaphthofuran

○倉持 幸司[1]、片上 千晶[2]、加茂 翔伍[1,2]、谷口 透[3]、門出 健次[3]、原 伸行[4]、今井 喜胤[4]、椿 一典[2] ([1]東理大理工、[2]京府大院生命環境、[3]北大院先端生命、[4]近大院総合理工)

○ Kouji Kuramochi[1], Chiaki Katakami[2], Shogo Kamo[1,2], Tohru Taniguchi[3], Kenji Monde[3], Nobuyuki Hara[4], Yoshitane Imai[4], Kazunori Tsubaki[2] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Kyoto Pref. Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Kindai Univ.)

π 電子共役有機化合物の有機エレクトロルミネッセンス (EL) への応用が広く研究されている。なかでも有機溶媒に可溶な U 字型ジナフトフラン **1** に関しては、塗布法による有機 EL デバイスの作製が低コストで実現されている (**Figure 1A**)。そこで我々はナフトフラン類の特異な物性に興味を持ち、1,4-ジヒドロキシナフタレン (**2a**) もしくはそのモノメチルエーテル体 **2b** を出発原料としてオリゴナフトフラン **3** ～ **5** の短工程かつ効率的な合成法の開発に取り組んだ (**Figure 1B**)。

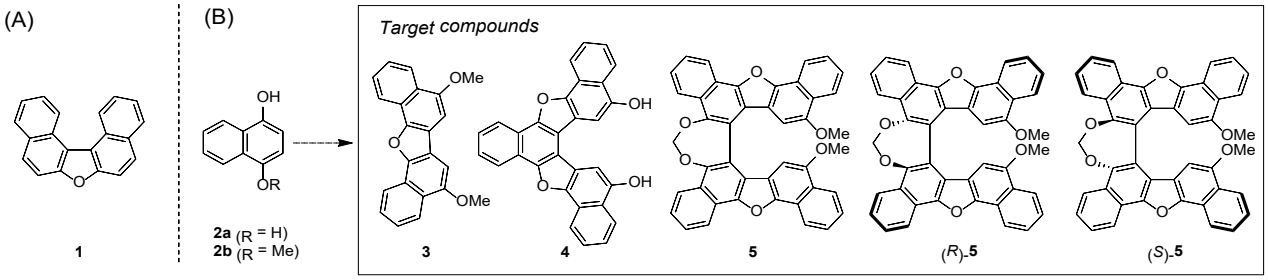


Figure 1. Structures of (A) dinaphthofuran **1** and (B) target oligonaphthofurans **3**-**5**

二量体 **3** と三量体 **4** は、**2b** もしくは **2a** をそれぞれ塩化スズ(IV) で処理することで、わずか一工程で合成することに成功した。また四量体 **5** は **2b** の連続する二量化反応とアセタール化反応により四工程で合成することができた。さらに四量体 **5** をキラル HPLC により光学分割し、軸性不斉に基づく両エナンチオマーを得ることに成功した。両エナンチオマーの絶対立体配置は、VCD スペクトルと量子化学計算 {DFT B3LYP/6-311G(d,p)} で決定した。

二量体 **3** と四量体 **5** は有機溶媒中で青色に発光し、四量体 **5** は固体発光を示した。光学活性体 (*R*)-**5** と (*S*)-**5** の CD スペクトル (**Figure 2A**) は驚くほど複雑な形状を示し、電子遷移モーメントが複雑に絡み合っていることが明らかになった。さらに (*R*)-**5** と (*S*)-**5** には円偏光発光 (CPL) 特性が見出された (**Figure 2B**)。円偏光とは、右円偏光と左円偏光に偏りの生じた光のことである。円偏光を発光し、しかも固体発光する四量体 **5** は、三次元ディスプレイやセキュリティ塗料などの次世代光情報技術に応用されることが期待される。

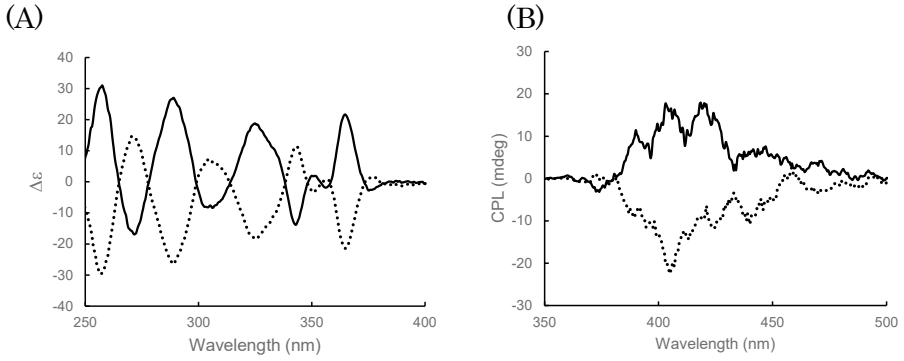


Figure 2. (A) CD and (B) CPL spectra of (*S*)-**5** (solid lines) and (*R*)-**5** (dashed lines)

naphthofuran, circularly polarized luminescence, vibrational circular dichroism

発表責任者：倉持幸司（kuramoch@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3A16p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A16 会場

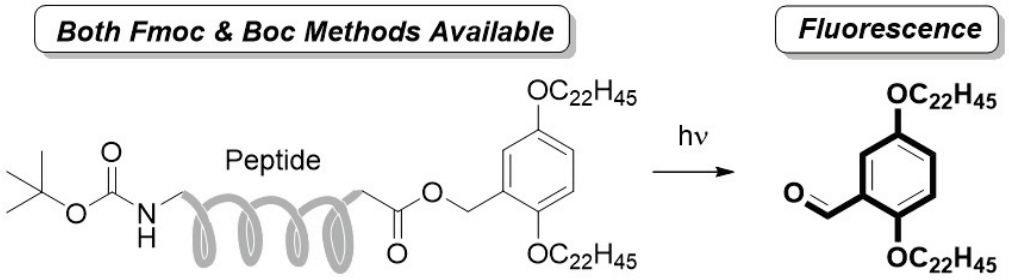
蛍光機能をもつ疎水性ベンジルアルコールの開発と液相ペプチド合成への応用

Development of Fluorometric Hydrophobic Benzyl Alcohol for Soluble Tag Assisted Liquid-phase Peptide Synthesis

○森川 栄美、若松 弘起、菅井 正枝、岡田 洋平、千葉 一裕（東農工大）
○Eimi MORIKAWA, Hiroki WAKAMATSU, Masae SUGAI, Youhei OKADA, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

ペプチド医薬品は従来の低分子医薬品の有機合成化学的に安価に大量合成できる点と高分子のタンパク医薬品の高い特異性をもち幅広い疾患領域を対象とできる点の両方の利点を併せ持つと期待されている。ペプチド合成の主流となっている固相法は分離精製操作が簡便であり、自動合成やコンビナトリアル合成を可能にしている。一方で、液相法によるアプローチでは高い反応性が獲得されるとともに、従来の分析技術によるモニタリングが可能である。我々の研究室では、疎水性ベンジルアルコールを可溶性担体として用いた液相ペプチド合成法の開発に取り組んできた。本手法では、反応を均一な液相で行った後に担体を導入したペプチドを沈殿させて固相として回収することができる。したがって、カラムクロマトグラフィーなどの煩雑な分離精製の必要がない反応性の高いペプチド合成が可能である。

本研究では、発色性、蛍光性、適度な酸耐性のような機能性を有する疎水性ベンジルアルコール担体を開発し、液相ペプチド合成や新たな定量法へ応用することを目的とした。置換様式の異なるメトキシベンジルアルコールを用いて探索した結果、2,5 位に長鎖アルコキシ基をもつ担体が適度な酸耐性をもち Boc 法と Fmoc 法の両方に適用可能であることがわかった。2,5-置換の担体および担体が結合したペプチドは、酸性条件下において TLC 上および溶液状態で鮮やかな緑色に発色した。また UV 照射によって 2,5-置換の担体が蛍光性を獲得することを発見し、その蛍光特性は、ペプチドの側鎖や保護基，配列の長さに依存しないことがわかった。発表では、蛍光特性の詳細や Boc 法、Fmoc 法を併せたモデルペプチド合成、蛍光を利用した定量検定への応用について報告する。



Wakamatsu, H.; Okada, Y.; Sugai, M.; Hussaini, S. R.; Chiba, K. *Asian. J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1584-1588.

Liquid-phase peptide synthesis, fluorescence, UV irradiation

発表責任者：千葉一裕（chiba@cc.tuat.ac.jp）

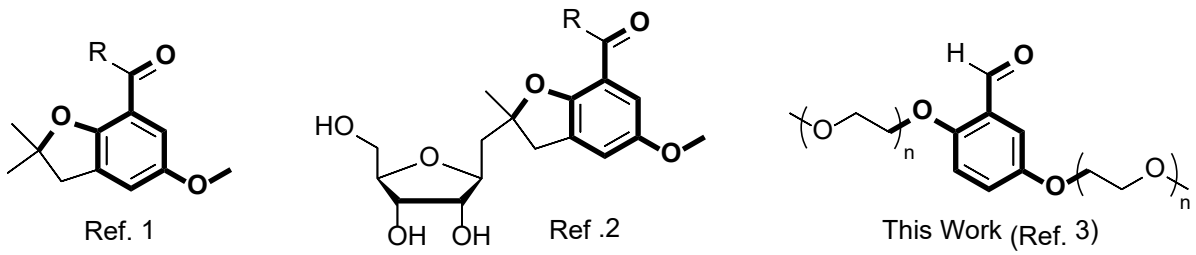
講演番号：3A16p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A16 会場

水素結合によって誘起されるベンズアルデヒド型蛍光色素
Hydrogen-Bonding-Induced Benzaldehyde-Based Fluorophores

○岡田 洋平、菅井 正枝、千葉 一裕（東農工大）
○Yohei OKADA, Masae SUGAI, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

有機 LED や化学・生物センサーに広く応用されることから，新たな蛍光色素の設計・合成は依然として重要な課題となっている．共役系を延長することで合理的に新しい色素を創出することができるものの，ケミカルバイオロジーにおけるプローブを志向する上ではプッシュ―プル効果を活かした水溶性の低分子であることが望まれる．

我々はこれまでに有機電解法を用いた反応開発に取り組み，特にフェノールとアルケンの[3 + 2]付加環化によって得られるジヒドロベンゾフラン誘導体が高度な蛍光性を示すことを見出している．[1] 発光波長がベンゼン環の電子密度によってチューニングできることから，これをマルチカラーの蛍光核酸アナログ合成へと応用した例も報告している．[2] これらの化合物にソルバトクロミズムが示されたことから様々な有機溶媒を用いて体系的に蛍光特性を評価したところ，水素結合ドナーを有する溶媒中においては，ジヒドロベンゾフラン骨格のない単純なビスアルコキシベンズアルデヒドであっても高い蛍光性を示すことが見出された．[3] このような蛍光特性は溶媒の極性とは相関が見られず，あくまでも水素結合ドナーに応答して発光することが確認されている．エチレングリコール鎖を取り付けることで水溶性を獲得するとともに第二のアルデヒド基を導入することでプッシュ―プル効果を高め，共役系を延長することなく緑色蛍光を実現した．これらの蛍光色素はいずれも高い量子収率とストークスシフトを示し，溶媒のわずかな水素結合特性の違いに応じて発光波長が変化する．



Ref. 1　　Ref .2　　This Work (Ref. 3)

(1) Kim, S.; Hirose, K.; Uematsu, J.; Mikami, Y.; Chiba, K. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6284–6288.
(2) Okada, Y.; Shimada, K.; Kitano, Y.; Chiba, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1371–1375.
(3) Okada, Y.; Sugai, M.; Chiba, K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10922–10929.

hydrogen bonding, benzaldehyde, fluorophore

発表責任者：千葉一裕（chiba@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3A17a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A17 会場

フェナジノマイシン生合成におけるテルペン環化酵素の同定と機能解析

Identification and functional analysis of the terpene cyclase involved in phenazinomycin biosynthesis

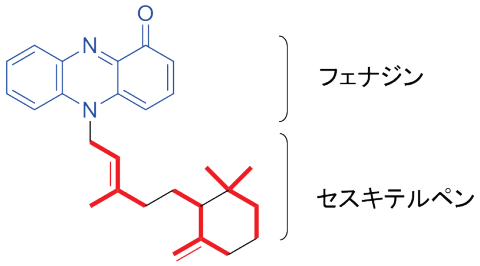
○加藤 輝仁、中尾 智世、白石 太郎、西山 真、葛山 智久（東大生物工学セ）
○ Teruhito KATO, Tomoyo NAKAO, Taro SIRAISHI, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA (BRC, UTokyo)

【目的】

フェナジノマイシンは *Streptomyces* sp. WK2057 の生産する抗菌活性・抗腫瘍活性を示す化合物であり、フェナジン骨格の窒素原子に特徴的な単環式セスキテルペンが結合した構造からなる。これまでに異種発現によりフェナジノマイシンの生合成遺伝子クラスターの同定を報告した。[1] 本研究では、その特異な単環式セスキテルペン構造の形成機構をはじめとしたフェナジノマイシン生合成経路の全容の解明を目的とした。

【方法と結果】

フェナジノマイシンの構造から、単環式セスキテルペン骨格の形成は末端二重結合のプロトン化により環化反応を開始するクラス 2 様テルペン環化酵素により触媒されると予想した。そこで、フェナジノマイシン生合成遺伝子クラスター中からクラス 2 様テルペン環化酵素を探索した結果、Orf24 を見出した。しかしその配列中には機能の不明な領域もあり、クラス 2 に特有の DXDD モチーフが存在しないことから新奇な酵素であると考えられる。そこでこの酵素の機能を明らかにするために、精製した Orf24 組換え酵素を用いて FPP を基質に反応を行った。得られた反応産物を脱リン酸化処理し、GC-MS 分析に供した結果、酵素依存的に未同定化合物の形成を示すピークを検出した。このピークについて構造の相同性検索を行った結果、環状化合物と高い相同性を示した。この結果から Orf24 は FPP の環化反応を触媒することが強く示唆された。現在この反応産物の構造解析を行っておりその結果についても発表する予定である。この結果とこれまでの解析結果からフェナジノマイシンの生合成経路の全容を提唱する。



フェナジノマイシン

【参考文献】

1）中尾智世 他、 日本農芸化学会 2013 年度大会 3C22a02

isoprenoid, phenazine, Streptomyces

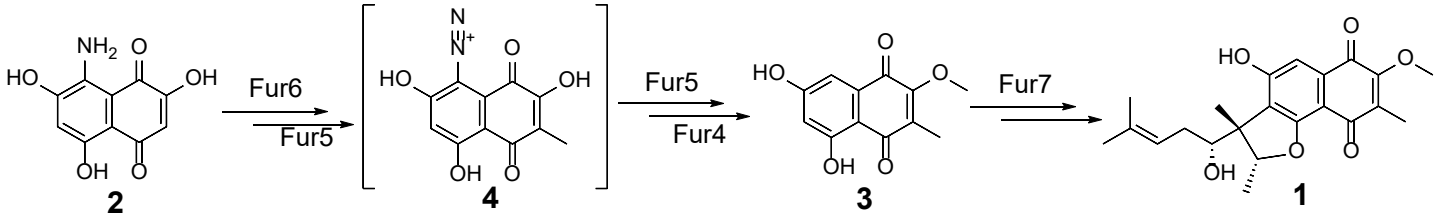
講演番号：3A17a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A17 会場

放線菌のメロテルペノイド生合成における普遍的脱アミノ化機構の解析

Analysis of the common deamination mechanism in the biosynthesis of meroterpenoids from *Streptomyces*

○野口 智弘、工藤 慧、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Tomohiro NOGUCHI, Kei KUDO, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA（BRC, UTokyo）

［目的］ Furaquinocin D (**1**)は、放線菌によって生産されるメロテルペノイドの一種であり、21 個の遺伝子(*fur1–21*)によって生合成される[1]。これまでに、**1** の生合成中間体として、malonyl-CoA から Fur1,2,3 によって生合成される 8-amino-flaviolin (**2**)が同定されている[2]。興味深いことに、Fur1–3 のホモログは他のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター中にも保存されており、このことは、**2** がメロテルペノイドに共通の生合成中間体であることを示唆している。さらに、いずれの最終産物のメロテルペノイドにもアミノ基が存在しないことを考え合わせると、**2** 以降に起こる脱アミノ化は放線菌の生産するメロテルペノイド生合成における共通経路であることが強く示唆される。また、この脱アミノ化はアミノ基が水素原子に置換される形で起こっており、アミノ基がカルボニル基に置換される通常の酸化的脱アミノ化とは異なる新奇の反応機構によるものであることが推測される。**1** の生合成においては、ゲラニル基転移酵素（Fur7）の基質である生合成中間体、2-methoxy-3-methylflaviolin (**3**)も同定されている[3]。**3** には既にアミノ基が存在しないことから、**2** から **3** への過程で未知の脱アミノ化が起こると考えられる。本研究では、この新奇脱アミノ化反応機構の解明を目的とした。
［方法］ Fur4 と Fur6 はいずれも methyltransferase であり、Fur5 は他のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター間でも高度に保存された機能未知タンパク質である。そこで Fur5 が脱アミノ化反応に関与すると推定し、これらの酵素の *in vitro* 解析を実施した。
［結果・考察］ **2** から **3** への変換が亜硝酸塩と ATP と SAM の存在下で Fur4,5,6 の 3 つの酵素依存的に起こることを見出した。また、脱アミノ化反応が Fur5 依存的に進行することを明らかにした。さらに Fur5 による脱アミノ化の過程でジアゾ基を持つ化合物 **4** を経由していることも強く示唆された。発表では 2 から 3 への反応機構について考察する。



［1］T. Kawasaki, *et al. J. Bacteriol.* 188：1236（2006）
［2］S. Isogai, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22：5823（2012）
［3］T. Kumano, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285：39663（2010）

polyketide, terpenoid, deaminase

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A17a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A17 会場

プレニルインドール化合物 carquinostatin A の生合成研究

Biosynthetic studies on the prenylated indole compound, carquinostatin A

○小林 正弥[1]、新家 一男[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○Masaya KOBAYASHI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST)

【背景・目的】放線菌 *Streptomyces* sp. CS79 株の生産する carquinostatin A (CQS)は、特徴的な 6-5-6 員環構造からなるカルバゾールを基本骨格とし、オルトキノンおよびジメチルアリル基を有するプレニルインドール化合物である。今日までに発見されたカルバゾール構造を有する天然物の大半は真核生物が由来であり、バクテリアでの報告例は極めて少なく、また生合成に関する知見も限られている。CQS 生合成機構の全容解明を目指したこれまでの取り組みにより、CQS の生合成遺伝子の取得と異種生産、さらにカルバゾール骨格にジメチルアリル基を付加するプレニル基転移酵素 CqsB4 の同定に成功している。本発表では、カルバゾール骨格形成機構を含む CQS 生合成の全容を解明したので報告する。

【方法】標識前駆体を用いたトレーサー実験の結果から、カルバゾールの炭素骨格は L-トリプトファン、ピルビン酸、2 分子の酢酸に由来することが示唆されていた。この結果を考慮し、カルバゾール生合成の初期段階では L-トリプトファンおよびピルビン酸の縮合、およびアシル側鎖の付加が生じると考えられる。次いで、これらの炭素鎖を骨格として閉環反応が進み、6-5-6 員環構造が形成されると予想した。そこで、炭素−炭素結合形成および環化反応に関与すると推定したケトアシル ACP 合成酵素 CqsB1、機能未知タンパク質 CqsB2、チアミン依存型酵素 CqsB3 に着目し、これらの組換え酵素を用いて *in vitro* 解析を実施した。

【結果・考察】*in vitro* 反応産物の解析の結果、CqsB1, 2, 3 の全酵素を含む反応系においてのみ、カルバゾール骨格の形成に加えてオルトキノンの形成も確認することができた。この結果から、カルバゾール骨格の生合成における一連の増炭、閉環、酸化反応の全てを CqsB1, 2, 3 が担うことが明らかとなった。とりわけ、CqsB2 は閉環反応を触媒しオルトキノンを生成するカルバゾール環合成酵素であることが判明した。発表では、CqsB1, 2, 3 のそれぞれの酵素が触媒する反応の詳細について報告する。

Streptomyces, biosynthesis, alkaloid

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A17a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A17 会場

Streptomyces griseus IFO13350 におけるイミニマイシン類の生合成解析
Analysis of iminimycin biosynthetic pathway in *Streptomyces griseus* IFO13350

○堤 隼馬[1]、勝山 陽平[1]、手塚 武揚[1]、宮野 怜[2]、稲橋 佑起[3]、高橋 洋子[3]、中島 琢自[3]、大西 康夫[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]北里大・感染制御科学府、[3]北里大・北里生命科学研究所)
○Hayama Tsutsumi[1], Yohei Katsuyama[1], Takeaki Tezuka[1], Rei Miyano[2], Yuki Inahashi[3], Yoko Takahashi[3], Takuji Nakashima[3], Yasuo Ohnishi[1] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [3]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【目的】イミニマイシン類は化合物の物理化学的性質に着目した Physicochemical screening を用いて *Streptomyces griseus* OS-3601 より見出された化合物である。[1,2] これら化合物群はイミニウム基や octahydroindolizine 骨格といった、放線菌の生産する天然物において非常に珍しい構造を有しており、その生合成機構には新規な酵素反応が関与していることが期待される。本研究ではイミニマイシン類生合成経路を解析することにより、これら特徴的な構造の形成に関与する酵素を発見し、その反応機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】OS-3601 株のゲノム配列は未知であったため、ゲノム配列が既知である *S. griseus* IFO13350 株がイミニマイシン類を生産するかどうかを調べた結果、本菌株も OS-3601 株と同程度の量のイミニマイシン類を生産することが確認できた。そこでイミニマイシン類生合成遺伝子クラスターを見出すべく、octahydroindolizine 骨格を有する cyclizidine の生合成遺伝子クラスター[3]を指標に IFO13350 株ゲノムを探索した結果、29 個の ORF から構成される生合成遺伝子クラスターを見出し、このクラスターを *imi* クラスターと命名した。*imi* クラスターはイミニマイシン類の骨格形成を担うⅠ型ポリケタイド合成酵素、窒素を導入するためのアミノ基転移酵素といったイミニマイシン類の生合成に関与すると予想される酵素をコードする遺伝子を含んでいた。
クラスター中のアミノ基転移酵素をコードする遺伝子を in-frame にて破壊した結果、イミニマイシン類の生産が消失し、新たな化合物の蓄積が見られた。また、アミノ基転移酵素をコードする遺伝子をゲノム挿入型のプラスミドを用いて導入することにより、遺伝子破壊株のイミニマイシン類の生産能が回復した。以上の結果より、この遺伝子クラスターがイミニマイシン類の生合成を担うことが明らかとなった。次に、このクラスターにおいて生合成に関与すると予想された 8 個の遺伝子の破壊株を作製し、破壊株と野生株との間で代謝比較を行った。その結果、7 つの遺伝子破壊株において、イミニマイシン類の生産が消失し、うち 6 株で未知の化合物が蓄積していた。現在、新たに蓄積した化合物の構造解析を行うとともに、クラスター中の他の遺伝子の破壊株の作製と代謝解析を行うことにより、イミニマイシン類生合成経路の解明に取り組んでいる。

1) Nakashima, T. *et al. J. Antibiot*, 2016, 69 (8), 611-615. 2) Nakashima, T. *et al. Tetrahedron Lett.* 2016, 57(30), 3284-3286. 3) Huang, W. *et al. Org Lett.* 2015, 17 (21), 5344-5347.

Streptomyces, biosynthesis, iminium

講演番号：3A17a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A17 会場

Streptomyces sp. IFM11307 由来芳香族ポリケタイド yoropyrazone 生合成経路の解析
Study on the biosynthetic pathway of the aromatic polyketide yoropyrazone from *Streptomyces* sp. IFM11307

勝山 陽平[2]、○藤田 夏澄[1]、當銘 一文[3]、石橋 正己[4]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工、[3]富山大・和漢研、[4]千葉大院・薬)
Yohei KATSUYAMA[2], ○Kasumi FUJITA[1], Kazufumi TOUME[3], Masami ISHIBASHI[4], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [3]Ins. of Nat. Med., Univ. of Toyama, [4]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Chiba Univ.)

【背景・目的】　腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）耐性のガン細胞に細胞毒性を示す yoropyrazone は、養老渓谷から単離された放線菌 *Streptomyces* sp. IFM11307 が生産する二次代謝産物であり、芳香族アミノ基、スピロ環、ピリダゾン環をもつ芳香族ポリケタイドである[1)]。これらの特徴的な部分構造の生合成機構については不明な点が多く、新規酵素の発見が期待できるため、yoropyrazone 生合成経路の解明に取り組んだ。

【方法と結果】 放線菌において、芳香族ポリケタイドの多くはII型ポリケタイド合成酵素（PKS）により生合成されることが知られている。そこで、*Streptomyces* sp. IFM11307 のゲノムを次世代シークエンサーPacBio で解読し、II 型 PKS 遺伝子を探索した。その結果、2 組の ketosynthase (KS) -chain length factor (CLF) 遺伝子が見つかった。両者は約 45 kb 離れて存在しているが、周辺には多くの生合成関連酵素がコードされており、2 つの KS-CLF 遺伝子を含む約 50 kb の領域が 1 つの生合成遺伝子クラスターを形成していると予測した。そこで、本遺伝子クラスター中の 4 つの遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いて破壊し、得られた破壊株の代謝産物を解析した。その結果、*orf5512*、*orf5536* (luciferase-like monooxygenase)、*orf5545*、*orf5557* 破壊株において yoropyrazone の生産が消失し、このクラスターが yoropyrazone の生合成を担うことが示された。また、3 つの遺伝子破壊株において新たな化合物の蓄積が見られたため、これらの化合物を ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, H-H COSY, HMQC, HMBC, HR-MS により解析し、その構造を明らかにした。*orf5545* 破壊株においては griseusin とその類縁体（pyranonaphthoquinone）の蓄積がみられ、*orf5545* にコードされる amino transferase が yoropyrazone 芳香環のアミノ基の導入に必須であることが示された。また、*orf5557* 破壊株では RM20b および RM20c [2)]が蓄積した。これらは 9 位のケトンが還元された炭素数 20 のポリケトメチレン鎖が非酵素的に環化した化合物であると予想されることから、*orf5557* にコードされる polyketide cyclase/dehydrase が環化反応を触媒すること、および上述したアミノ基の導入はポリケタイド合成の初期には起こらないことが示唆された。一方、*orf5512* 破壊株では *O*-deacetylyoropyrazone が蓄積し、*orf5512* にコードされる acyltransferase が yoropyrazone の *O*-acetyl 基形成に関与することが示された。

1) Abdelfattah *et al.*, *J. Antibiot.* **65**, 245, 2012; 2) Hong *et al*., *Biochemistry*, **33**, 9321-9326, 1994

biosynthesis, *Streptomyces*, polyketide

講演番号：3A17a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A17 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* のシグナル分子生合成における P450 モノオキシゲナーゼの基質認識多様性の解析

Substrate recognition of a P450 monooxygenase involved in signal molecule biosynthesis in *Streptomyces rochei*

○手島 愛子、波多江 希、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Aiko TESHIMA, Nozomi HADAE, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、二次代謝産物として抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)を生産し、それらの生合成はシグナル分子 *Streptomyces rochei* butenolide (SRB)により厳密に制御されている。培養初期には SRB レセプターSrrA が転写活性化因子 *srrY* の上流に結合して転写抑制が行なわれている。培養中期になると SRB 合成酵素 SrrX が SRB を合成し、本分子が SrrA と結合する。その結果 SRB-SrrA 複合体が遊離し、 *srrY* の転写が開始されることで LC 及び LM 生産が誘導される。

当研究室ではこれまでに SRB1 (2-(1’-hydroxyl-6’-oxo-8’-methylnonyl)-3-methyl-4-hydroxybut-2-en-1,4-olide) および SRB2 (2-(1’-hydroxyl-6’-oxo-8’-methyldecyl)-3-methyl-4-hydroxybut-2-en-1,4-olide) の化学構造を決定しており、現在は生合成経路の解明を目指している。*S. rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍には P450 水酸化酵素遺伝子 *srrO* などがコードされており、遺伝子破壊株の代謝産物解析によって、*srrO* が SRB 生合成において 6’位酸化反応に関与していることを明らかにした。今回は化学合成 6’-deoxo-SRB を用いて基質特異性および 6’-deoxo-SRB の抗生物質生産誘導活性を解析した。

【方法および結果】

SrrO 発現ベクターを組み込んだ *S. lividans* の形質転換体に 6’-deoxo-SRB1 の(1’R), (1’S) 体混合物を添加培養し、生成物の経時変化をキラル HPLC 解析によって確認したところ、両異性体とも同程度の割合で SRB に変換された。このことから、SrrO は C-1’位の立体化学に寛容であることがわかった。

さらに、6’-deoxo-SRB と SRB の抗生物質生産誘導活性について、特異的リセプターSrrA との結合親和性解析（ゲルシフトアッセイ）およびバイオアッセイを指標にして比較解析を行った。本発表では、これらの結果について詳しく述べる。また、現在 6’-deoxo-SRB ホモログの合成および、基質特異性と抗生物質生産誘導活性の解析を行っており、これについても合わせて報告する。

biosynthesis, P450, secondary metabolite

発表責任者：手島愛子（m162855@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A17a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A17 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* におけるキノン補酵素のと構造および生合成の解析
Structural and biosynthetic analyses of quinone cofactor in *Streptomyces rochei*
○原 圭佑、梅代 亜紗子、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Keisuke HARA, Asako UMESHIRO, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は線状プラスミド pSLA2-L、-M、-S をもち、ポリケチド抗生物質 lankacidin C (LC)を生産する。pSLA2-L 上には LC 生合成遺伝子(*lkc*)クラスターが存在し、その中には補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)生合成遺伝子(*lkcK-lkcO*)が含まれている。キノン補酵素生合成遺伝子 *lkcL* (*pqqC*)の遺伝子破壊株では LC を生産せず、系外から PQQ を添加したところ、LC 生産が回復した。このことから、LC 生産には PQQ などのキノン補酵素が必須であると示唆された。グラム陽性菌において PQQ 生合成クラスターが発見されたのは本菌が初めてであるが、本菌におけるキノン補酵素（SRO−Q）の生合成経路およびその構造は不明であった。そこで本研究では、(1)*S. rochei* におけるキノン補酵素生合成経路の解明、(2) LC 生合成におけるキノン補酵素の構造決定、を目指す。

【方法および結果】

(１) 本菌におけるキノン補酵素(SRO-Q)の生合成経路を明らかにするため、SRO-Q の前駆体ペプチド遺伝子 *lkcK*(*pqqA*)の破壊株を作製し、その代謝産物解析を行なったところ、LC を生産せず、その中間体である lankacidinol 類の蓄積が認められた。このことから、*lkcK* は SRO-Q の生合成に必須の遺伝子であることが明らかになった。現在、SRO-Q 非生産株(*⊿lkcL*)などを用いた破壊株相補の実験を進めている。また、*⊿lkcK* では親株に見られないスポットが確認できたため、この化合物の解析を行なっている。

(２) SRO-Q の構造決定を行うため、培養上清を酢酸エチルで抽出したのち、酸性条件下でクロロホルムによる抽出を行なった。イオン交換クロマトグラフィーによる分画後、SRO-Q 非生産株を検定菌としたバイオアッセイを行い、活性のみられた画分を取得した。画分をスペクトル解析した結果、PQQ に特徴的なスペクトルは見られなかった。このことから、本株が生産するキノン補酵素 SRO-Q は、PQQ とは異なるクロモフォアを有する可能性が示唆された。LC 生産に必要なキノン補酵素の最小誘導濃度は PQQ 換算で 8.02 nM であった。このことから、本菌で生産される SRO-Q はごく微量であると考えられた。現在、SRO-Q の構造を明らかにするため、*⊿lkcK* を用いた SRO-Q 中間体の取得を試みている。

pyrroloquinoline quinone, *Streptomyces*, antibiotics

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A17a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A17 会場

Maniwamycin の生合成遺伝子クラスターの解析および生物活性
Analysis of biosynthetic gene cluster and biological activity of maniwamycin
○達川 綾香[1]、岸本 拓也[1]、福本 敦[2]、安齊 洋次郎[2]、荒川 賢治[1]([1]広島大院・先端研、[2]東邦大・薬)
○Ayaka TATSUKAWA[1], Takuya KISHIMOTO[1], Atsushi FUKUMOTO[2], Yojiro ANZAI[2], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Toho Univ.)

【目的】
放線菌は抗生物質を生産する産業微生物として知られており、30 種以上の二次代謝産物生産能を有しているが、通常培養では約 2 割の代謝産物しか確認されていない。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、通常培養において主に 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）、ランカマイシン（LM）を生産するが、LC、LM 生合成遺伝子および転写リプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株(*ΔsrrB ΔlkmE ΔlkcF-KR1*)では、アゾキシアルケン型化合物 KA57-A が蓄積した。KA57-A は通常培養では検出されない化合物であり、遺伝子工学による休眠二次代謝の覚醒に成功した。KA57-A におけるアゾキシ結合の形成メカニズムは興味深く、さらに本化合物がクロモバクテリウム・ビオラセウムの quorum sensing を阻害することも明らかとなっている。しかし、アゾキシ結合の形成に関わる生合成遺伝子は未だに同定されていない。そこで本研究では、KA57-A の構造類似体 maniwamycin 生産菌 TOHO-M025 株に注目し、生合成遺伝子の比較解析によるアゾキシ結合形成機構の解明および生合成遺伝子の人為改変による構造多様化を目指した。

【方法・結果】
TOHO-M025 株について PacBio RS-Ⅱ次世代シークエンス解析を行ったところ、コンティグが 2 つに集約され、コンティグ 1（8,450,433 bp）およびコンティグ 2（2,196,081 bp）が得られた。KA57-A および valanimycin などのアゾキシアルケン化合物生合成遺伝子クラスターと比較したところ、*vlmA*、*vlmH*、*vlmL* ホモログなど、共通の遺伝子群を見出すことができた。また、TOHO-M025 株を培養し、代謝産物を酢酸エチルで抽出したところ、maniwamycins の生産を確認できた。さらに、Rf 0.8（$CHCl_3$-MeOH=15:1）に強い UV 活性スポットが確認できたため、ゲル濾過およびシリカゲルクロマトグラフィーによって分画、精製したところ、単一の化合物が得られた。本化合物の分子式は $C_{12}H_{22}O_4N_2$ であり、アゾキシ結合の存在が示唆されたが、当該株において未同定化合物であったため二次元 NMR による構造解析を行った。maniwamycin F のデータとの比較解析を行ったところ、アミドの部分がメチルエステルとなることがわかった。得られた新規化合物 maniwamycin G の収量は 0.58 mg/L であった。生物活性解析を行ったところ、本化合物も quorum sensing 阻害活性を呈することが明らかとなった。現在、アゾキシ結合形成への関連が予想される遺伝子の破壊株の作製などを行っている。

Streptomyces, azoxyalkene, biosynthesis

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A17a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A17 会場

ゲノムマイニングにより見出した新規ホモポリアミノ酸の構造及びその生合成機構の解析
Biosynthetic study of a novel homo poly-amino acid discovered through genome-ming.

○福本 響[1]、濱野 吉十[2]、老川 典夫[1]、山中 一也[1]([1]関西大・化生工、[2]福井県大・生物資源)
○ Hibiki FUKUMOTO[1], Yoshimitsu HAMANO[2], Tadao OIKAWA[1], Kazuya YAMANAKA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Fukui Pref. Univ.)

【目的】天然に見出される遊離の“ホモ”ポリアミノ酸としては、*Bacillus* 属細菌が生産するγ-poly-glutamic acid（γ-PGA)と数種の放線菌が生産するε-poly-L-lysine（ε-PL)、β-poly-L-diaminopropionic acid（β-PDP)及びγ-poly-L-diaminobutyric acid（γ-PDB)の 3 種が知られている。これらの内、ε-PL 及びγ-PDP は膜結合型 NRPS 様ペプチド合成酵素（Pls）によって生合成されることが明らかにされており、γ-PDB についても生産菌ゲノムにホモログ遺伝子が見出されることから同様に生合成されるものと推定できる。これらのことから、我々は Pls 様ペプチド合成酵素が多様な未知のホモポリアミノ酸合成酵素として他の微生物にも広く分布しているものと推測し、ゲノムマイニングによる新規ポリアミノ酸の探索を進めてきた。これまでの研究に於いて、ゲノム上に二つの *pls* ホモログ遺伝子を有する放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* が、天然物としては稀な D 体の 2,4-diaminobutyric acid(D-dab)のみから成るポリアミノ酸(D-PDB)に加え、もう一種の未知のホモポリアミノ酸を著量併産することを見出している。そこで本研究では、本菌が生産する未知ホモポリアミノ酸の同定及び両ポリアミノ酸生合成機構の解明を目的として研究を行った。
【方法】*S. hindustanus* 培養液上清から両ポリマー化合物を分離した後、LC-MS 及び MALDI-TOF/MS にてそれぞれの鎖長及び部分構造情報を得た後、塩酸加水分解物を OPA/BOC 誘導体化し、HPLC 分析に供することで構成アミノ酸残基を同定した。更にそれぞれのポリアミノ酸生合成に関与すると予測される Pls ホモログの基質アミノ酸活性化ドメイン(A-domain)の基質特異性評価、及び遺伝子破壊実験を通して両ポリアミノ酸生合成酵素の同定を試みた。
【結果及び考察】*S. hindustanus* ゲノム上に見出した 2 つの *pls* ホモログ遺伝子の内、D-Dab 代謝関連遺伝子群とクラスターを形成する推定 D-PDB 合成酵素遺伝子由来の A-domain は、予想した通り *in vitro* において D-Dab 特異的なアデニル化活性を示したことから、当該遺伝子の D-PDB 生合成への関与が強く示唆された。一方、D-PDB と共に生産される未知のポリアミノ酸は、LC-MS 及び MALDI-TOF/MS 解析において既知化合物であるε-PL とよく一致するスペクトルパターンを示した。しかしながら、その塩酸加水分解物は HPLC 分析において L-lysine 標品とは異なる保持時間を示し、更に推定生合成酵素の A-domain も L-lysine を基質として受容しなかった。これらのことから、我々が見出した D-PDB と共に併産されるポリマー化合物は、ε-PL とは構成アミノ酸残基が異なる新規なポリアミノ酸であることを確認した。現在、当該ポリアミノ酸の構造解析及びその生合成機構の解析を進めている。

poly-amino acid, non-ribosomal peptide, biosynthesis

発表責任者：山中一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A17a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A17 会場

機能性低分子化合物のポリリジン化による生体膜透過性・水溶性の一挙改善
Chemical modification of the bioactive small molecules with ε-poly-L-lysine for improving cell membrane permeability and water solubility

○武内 大和[1]、牛丸 和乗[2]、加藤 康夫[3]、丸山 千登勢[1]、濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]産総研、[3]富山県大・生工研セ)
○ Yamato TAKEUCHI[1], Kazunori USHIMARU[2], Yasuo KATO[3], Chitose MARUYAMA[1], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]AIST, [3]Toyama Pref. Univ.)

【目的】化合物の生体膜透過性を改善するための一般的な戦略は、化合物の疎水化である。しかし、その反面生じる水溶性の低下は、予期しない副作用の出現や製剤調製の複雑化など新たな問題を生む。実際に、上市されている医薬品の約 40%、候補化合物に至っては約 70%が難水溶性である現状において、いかにして薬物の水溶性を確保するかが創薬技術開発の重要なファクターとなっている。したがって、生体膜透過性と水溶性を一挙に改善させる化学修飾技術を開発できれば、現在の創薬スピードを加速させることができる。そこで我々は、機能性低分子化合物の化学修飾分子として、放線菌 *Streptomyces albulus* が生産する ε-poly-L-lysine（ε-PL）に着目した。高極性の天然ポリカチオンである ε-PL は、負に帯電した細胞膜に静電的に付着し、その一部は細胞膜を透過することが知られている[1]。そこで本研究では、薬剤などの機能性低分子を ε-PL 修飾することで水溶性と生体膜透過性を一挙に改善できると考え、生体膜非透過性の蛍光色素（FAM）、および、難水溶性の抗真菌抗生物質 Amphotericin B（AmpB）をモデル化合物として ε-PL 修飾法を確立し、その有効性を評価した。

【方法と結果】*S. albulus* における ε-PL 生産培養において、培地にアルコールを添加すると生産される ε-PL のカルボキシ末端にエステル結合でアルコールが導入されることが知られている[2]。そこでこのエステル合成反応を利用し、ε-PL に click 反応のためのアジド基を導入する方法を検討した。種々検討したところ、*S. albulus* の培養液に HO-PEG-N_3 を添加培養することで、ε-PL のカルボキシ末端に PEG-N_3 が高効率に導入され、得られた ε-PL-PEG-N_3 は化学的にも安定であることが分かった。そこで、本化合物を培養液から単離精製し、アルキン基を導入した DBCO-FAM および DBCO-AmpB との click 反応を行ったところ、ε-PL-PEG-N_3/DBCO-FAM および ε-PL-PEG-N_3/DBCO-AmpB の生成を LCMS 分析にて確認した。本発表では、ε-PL-PEG-N_3/DBCO-FAM における生体膜透過性評価の結果について紹介するとともに、ε-PL- PEG-N_3/DBCO-AmpB の水溶性および抗真菌活性について報告する。

【文献】

1. Hyldgaard, M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.,* 80, 7758-70 (2014).
2. Nishikawa, M. & Ogawa, K., *Appl. Environ. Microbiol.,* 72, 2306-12 (2006).

cell membrane permeability, polycation, click chemistry

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：3A17a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A17 会場

JBIR-34, -35 の生合成を担う非リボソームペプチド合成酵素 FmoA3 の X 線結晶構造解析
Crystal strucure of FmoA3, a nonribosomal peptide synthetase responsible for JBIR-34 and -35 biosynthesis

○曽根 薫[1]、原田 彩佳[2]、勝山 陽平[1]、千田 美紀[2]、新家 一男[3]、千田 俊哉[2]、大西 康夫[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]KEK、[3]AIST)
○Kaoru SONE[1], Ayaka HARADA[2], Yohei KATSUYAMA[1], Miki SENDA[2], Kazuo SHIN-YA[3], Toshiya SENDA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]KEK, [3]AIST)

【背景】JBIR-34, -35 は 4-メチルオキサゾリン環を有する非リボソームペプチドであり、放線菌 *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 により生産される[1]。発表者らは 4 つの非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）FmoA2, A3, A4, A5 を用いた JBIR-34, -35 の *in vitro* 合成系を構築し、FmoA2, A3 を中心に NRPS の機能解析を行ってきた。FmoA3 は α, α-二置換アミノ酸である α-methyl-L-serine を基質とすること[2]や脱水環化による 4-メチルオキサゾリン環形成を触媒することから、JBIR-34, -35 の生合成において特に重要である。FmoA3 のドメイン構成は Cy（ヘテロ環化）-A（アデニル化）-PCP（ペプチジルキャリアタンパク質）である。Cy ドメインは C（縮合）ドメインの派生型であり、C ドメインがペプチド結合形成のみを触媒するのに対し、Cy ドメインはペプチド結合形成と脱水環化を触媒する。
【結果】FmoA3 全長の X 線結晶構造解析を行い、分解能 2.4 Å の回折データを得た。これをもとに分子置換法を用いて位相を求め、FmoA3 の全体構造を決定した。A ドメインの C 末端領域および PCP ドメインとのリンカー領域の電子密度が観測されなかったが、これはこれらの部分が他の部分に比べて動的なためであると考えられる。Cy ドメインと A ドメインの位置関係は、既知の NRPS の C ドメインと A ドメインの位置関係と同じであった。一方、PCP ドメインの位置は非対象単位の選び方によって 2 通りの可能性が考えられるが、いずれの場合も過去に報告されている NRPS の PCP ドメインの位置とは一致しなかった。既知の C および Cy ドメインはいずれも活性中心に向かう 2 つのトンネルを有する。FmoA3 の Cy ドメインは、既知の C および Cy ドメインに比べて、アセンブリーライン上流側のトンネルが狭く、ペプチド結合形成を触媒するのが構造的に困難であることがわかった。これは、FmoA3 の Cy ドメインが縮合反応を触媒せずに脱水環化のみを触媒するという *in vitro* 実験の結果と符合する。また、既知の A ドメインとの構造比較から、α-methyl-L-serine の認識に Ala688 が重要であることが予想された。この残基を Val に置換したところ、α-methyl-L-serine が認識されなくなったが、L-serine の認識活性は失われなかった。この結果より、側鎖の小さなアミノ酸を 688 番残基に用いることによって、α-methyl-L-serine の α-メチル基が収納できるスペースが基質ポケット内に作られていることが示唆された。なお、FmoA3 と α-methyl-L-seryl-AMP の複合体の共結晶構造解析も行ってきたが、最近、3.2 Å の回折データが得られ、現在、解析中である。

以上、Cy-A-PCP のドメイン構造をもつ NRPS の全体構造、ペプチド結合形成を触媒しない Cy ドメインの構造、A ドメインの α, α-二置換アミノ酸の認識機構に関する初めての知見が得られた。

[1] Motohashi *et al*. (2010) *J. Nat. Prod*., **73**, 226. [2] Muliandi *et al*. (2014) *Chem. Biol.*, **21**, 923.

biosynthesis, nonribosomal peptide synthetase, X-ray crystallography

講演番号：3A17a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A17 会場

二次代謝特異的亜硝酸生合成経路により生合成される *Kutzneria albida* 由来新規天然物の探索

Screening of *Kutzneria albida* secondary metabolites synthesized using the secondary metabolism-specific nitrous acid biosynthetic pathway

勝山 陽平[2]、○山田 研人[1]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工)
Youhei KATSUYAMA[2], ○Akito YAMADA[1], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的・背景】放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産し、その生合成には多様な戦略が用いられている。我々は近年、放線菌 *Streptomyces cremeus* が生産する cremeomycin の生合成研究に取り組み、ジアゾ基形成に関わる、2 つの酵素（CreD, CreE）から構成される新規亜硝酸生合成経路を発見した[1]。また、BLAST 検索により、*creD*, *creE* のホモログ遺伝子は、*creD*, *creE* と同様にオペロンを形成して、放線菌ゲノムに広く分布していることが示された。通常、*creD*, *creE* ホモログの周辺には二次代謝産物生合成酵素をコードすると思われる遺伝子が存在することから、さまざまな放線菌において CreD, CreE ホモログにより生産された亜硝酸が二次代謝産物の生合成に利用されていることが予想された。そこで、我々はこの新規亜硝酸生合成経路を利用して生合成される二次代謝産物についての研究を展開してきた。今回、*Kutzneria albida* JCM 3240 について、*creD*, *creE* ホモログを含む生合成遺伝子クラスターを異種発現することで新規化合物の探索を試みた。

【方法・結果】*K. albida* において、*creD*, *creE* ホモログは上流の 10 個の遺伝子とともに単一のオペロンを形成していることが予想された。このオペロンは 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) の生合成酵素遺伝子を含み、3,4-AHBA を前駆体とした二次代謝産物の生合成に関与していると考えられた。このオペロンを PCR で増幅し、高コピープラスミドである pHKO4 の *tipA* プロモーターおよびゲノム組込み型プラスミドである pTYM19ep の *ermE** プロモーターの下流にそれぞれクローニングした。得られた 2 種類の異種発現用プラスミドを *Streptomyces lividans* にプロトプラスト法を用いて導入し、異種発現株を得た。2 つの異種生産株において新たに生産される化合物を見出すべく、種々の検討を行った結果、両株を Waksmann 培地で 4 日間培養（pHKO4 を利用した異種発現株は培養 2 日目に終濃度 5 mg/L のチオストレプトンを添加して遺伝子発現を誘導）した際、いずれにおいてもコントロールには見られない化合物 **1** が生産されていることが LC-MS 解析により明らかになった。また、いずれの培養液中にも、3,4-AHBA が蓄積していることがわかった。pHKO4 を利用した異種発現株がより多くの化合物 **1** を生産していたため、この株を用いて培養をスケールアップした。目的化合物を精製し、^{1}HNMR、COSY、HMQC、HMBC により解析した結果、化合物 **1** はインドール環および 3,4-AHBA に由来する骨格を持つ新規化合物であることが明らかとなった。現在、この化合物の生合成機構を解明するため、クラスター中に存在する各遺伝子の機能解析を行っている。

[1] Sugai, Y. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2016, **12**, 73.

biosynthesis, actinobacteria, secondary metabolite

講演番号：3A17a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A17 会場

組換え大腸菌を用いた flavonoid alkaloid の生産

Production of flavonoid alkaloid by enginnered *E. coli*

○大石 和敬、川嶋 智佳、谷 美生夏、相澤 光輝、長谷部 文人、鮒 信学（静県大食栄）
○Kazuhiro OOISHI, Tomoka KAWASHIMA, Mioka TANI, Teruki AIZAWA, Fumihito HASEBE, Nobutaka FUNA (Univ. of Shizuoka)

【目的】

植物の tropane alkaloid は様々な生理活性を有し、局所麻酔薬や伝統的嗜好品などとして利用されてきた。tropane alkaloid の構造上の最大の特徴は、Ornithine 由来の含窒素 5 員環と 3 つの炭素からなる架橋構造であり、この骨格は Tropinone 骨格と呼ばれている。Tropinone 生合成において、Ornithine decarboxylase 、Putrescine methyltransferase 、Methylputrescine oxidase により、Ornithine が含窒素 5 員環の化合物 *N*-Methyl-Δ^1-pyrrolinium cation（*N*-Mpyr）へと変換される。続いて、*N*-Mpyr と酢酸由来の C3 化合物が縮合・環化することで Tropinone 骨格が形成されると予想されているが、この反応は実証されておらず、生合成酵素も不明である。以上のように、tropane alkaloid の生合成には不明な点が多く、微生物生産は実現していない。我々は、Tropinone 骨格を形成する酵素の同定および tropane alkaloid の微生物生産を目指している。昨年度大会において、我々は、*N*-Mpyr の微生物生産を報告した。今年度は、*N*-Mpyr の生産系を用いたバイオトランスフォーメーションを行った。

【方法・結果】

N-Mpyr はイミニウムイオンであり、そのイミノ炭素は親電子性が強い。そのため、エノールなどにより容易に捕捉される。我々はこの性質を利用することで、flavonoid alkaloid の微生物生産を行った。まず、*N*-Mpyr を二通りの方法で合成した。1-Methylpyrrolidine を mCPBA で酸化し、1-Methylpyrrolidino *N*-oxide を合成した。1-Methylpyrrolidino *N*-oxide を TFAA で脱水し、*N*-Mpyr を得た。また、Methylamine を 4-Chlorobutanal diethylacetal により *N*-アルキル化し、生じた 4-Methylaminobutanal diethylacetal を加水分解することによって *N*-Methyl aminobutanal を得た。*N*-Methyl aminobutanal は直ちに *N*-Mpyr に異性化した。以上で調製した *N*-Mpyr と flavonoid の一種 Naringenin を緩衝液中で混合し、LC-HRMS で分析した。その結果、*N*-Mpyr と Naringenin が縮合して生成すると考えられる flavonoid alkaloid に相当するイオンのピークが LC-HRMS 分析によって確認できた。次に、 *N*-Mpyr を生産する組換大腸菌に、flavonoid の一種 Naringenin を投与し培養した。その結果、flavonoid alkaloid の微生物生産に成功した。Naringenin は A 環にグルシノール骨格を有しており、そのフェノール性水酸基のケトエノール平衡の過程で *N*-Mpyr が捕捉されたと考えている。

microbial production, flavonoid alkaloid, ornithine derived alkaloid

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A17a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A17 会場

粘液細菌 *Sorangium cellulosum* 由来 1,8-DHN 合成酵素群の機能解析

Characterization of bacterial enzymes catalyzing a synthesis of 1,8-DHN from *Sorangium cellulosum*

○曽根 祐輔、中村 修人、長谷部 文人、金 承榮、鮒 信学（静県大食栄）
○Yusuke SONE, Shuto NAKAMURA, Fumihito HASEBE, Seung-Young KIM, Nobutaka FUNA (Univ. of Shizuoka)

【目的】

Dihydroxynaphthalene（DHN）メラニンは、1,8-DHN が酸化的重合した茶褐色の高分子であり、主にカビが生産する。また、植物病原性カビの一部において、その感染に DHN メラニンの生産が必須である。カビにおいて、1,8-DHN は次のように生合成される。I 型ポリケタイド合成酵素（PKS）が malonyl-CoA から T4HN を与え、T4HN が還元および脱水の反応サイクルを二回経ることで 1,8-DHN が合成される。1,8-DHN の生合成酵素群は、真核微生物に特異であると考えられている。しかしながら、粘液細菌 *Sorangium cellulosum* 由来の *soceCHS1*[1)]を含むオペロンの異種発現を行い、このオペロン（bacterial DHN synthase オペロンと命名）が 1,8-DHN 合成酵素群であることを我々は明らかにしている。今回我々は、*bds* オペロンの BdsA および BdsB の機能解析を行った。

【方法および結果】

Bds 合成酵素の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 反応を行った。SoceCHS1 は、malonyl-CoA から T4HN を与えた。BdsA は、NADPH を補酵素として T4HN、T3HN からそれぞれ scytalone、vermelone を与えた。scytalone の絶対立体配置は、旋光度より *R* 体であると決定した。また、scytalone の光学純度は、誘導体のキラルセルクロマトグラフィーにより、>99.5%であった。さらに、反応速度論解析の結果、BdsA の *Km* は 95 μM であり、*k*cat は 0.1 sec^{-1} であった。BdsB は、(*R*)-scytalone、(*R*)-vermelone からそれぞれ T3HN、1,8-DHN を与えた。反応速度論解析の結果、BdsB の *Km* は 5.5 μM であり、*k*cat は 4.9 sec^{-1} であった。

【考察】

カビの DHN 合成酵素と細菌の Bds 合成酵素は以下の点で異なる。ポリケタイド合成は、カビではモジュール型の I 型 PKS[2)]であるが、細菌では単独型の III 型 PKS である。T4HN の還元反応は、カビの HNR[2)]は SDR スーパーファミリー(SF)であり、BdsA は AKR SF であり、両者は全く異なる。Scytalone の脱水反応は、カビの SD[2)]と細菌の BdsB は共に NTF2-like SF であるが、両者の相同性は非常に低い。以上のように、同一の化合物の生合成が異種間で保存されているが、その生合成酵素は異なることが判明した。なお、興味深いことに、*bds* オペロンは複数の植物病原細菌に保存されている。

【文献】

1) F. Gross *et al. Arch. Microbiol.* **185**, 28-38 (2006). 2) K. Lamgfelder *et al*. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 143–158. (2003).

melanin, *Sorangium cellulosum*, DHN

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A17a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A17 会場

脂肪族ギ酸エステルの生合成に関わるコナダニ由来 Baeyer-Villiger 酸化酵素の探索

Baeyer-Villiger monooxygenase of aliphatic formate biosynthesis in astigmatid mite

○荒谷 剛史[1]、森山 太介[1]、森 直樹[2]、桑原 保正[3]、清水 伸泰[1]([1]京都学園大バイオ環境、[2]京大院農・応用生命、[3]富山県大工・生工研セ)
○Tsuyoshi ARAYA[1], Daisuke MORIYAMA[1], Naoki MORI[2], Yasumasa KUWAHARA[3], Nobuhiro SHIMIZU[1] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Toyama pref. Univ.)

【目的】

コナダニの一種であるササガワダニ *Sancassania* sp. Sasagawa は必須脂肪酸である linoleic acid (LA) の生合成能をもち、分泌成分である不飽和炭化水素 (*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene とギ酸エステル(*Z,Z*)-8,11-heptadecadienyl formate (8,11-F17) は共に LA から合成される。同位体標識化合物の取り込み実験の結果から、8,11-F17 は LA から誘導される linoleyl aldehyde (LAld) を前駆体として生成されることが強く示唆された [1)]。そこで我々は、ダニ体内でアルデヒドを基質とした Baeyer-Villiger 酸化反応によりギ酸エステルが生じていると考えた。本研究ではダニはこの酸化反応を触媒する酵素 Baeyer-Villiger Monooxygenase (BVMO) を持つと仮説を立て、この酵素の同定を目指す。BVMO はすでに微生物や一部の植物 [2)]、またヒトの肝臓 [3)] などで発見されているが、ダニ由来のものは脂肪族アルデヒドを脂肪族ギ酸エステルに変換できる点で、既知の BVMO にはない反応を触媒する。

【方法と結果】

Sucrose を含む緩衝液とともにササガワダニを homogenate して粗酵素液を調製し、別途合成した LAld を基質として加え、8,11-F17 への変換を GC/MS で分析した。その結果、目的物への変換が確認できたので、ダニに BVMO あるいは類似の酸化酵素が存在する可能性を得た。そこで、遠心分離を行ったところ低速遠心後の沈殿物に酵素活性が見られたため、界面活性剤を用いた酵素の可溶化条件を種々検討した。現在は目的酵素の分離精製および重水素ラベル化 LAld-d_2 を基質とした酵素反応を検証中である。本発表では現在進行中の実験結果を含め、LAld から 8,11-F17 が生成する変換条件および目的酵素の諸性質を総合して報告する。

1) N. Shimizu *et al*. *PNAS* **114**, 2616-2621, 2017.
2) H. Leisch *et al. Chem. Rev.* **111**, 4165-4222, 2011.
3) W. George Lai *et al. Drug Metab. Dispos.* **39**, 61-70, 2011.

Baeyer-Villiger oxidation, Aliphatic formate, Mite

発表責任者：清水　伸泰（shimizu@kyotogakuen.ac.jp）

講演番号：3A17p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A17 会場

Large-terpene 合成酵素の結晶構造解析
Crystal structure of a large-terpene synthase

○藤橋 雅宏[1]、佐藤 努[2]、田中 勇真[1]、山本 大輔[1]、西 智之[2]、上田 大次郎[2]、村上 瑞気[2]、保野 陽子[3]、関原 あい[3]、福 和真[3]、品田 哲郎[3]、三木 邦夫[1] ([1]京大院理、[2]新潟大農、[3]阪市大院理)
○Masahiro FUJIHASHI[1], Tsutomu SATO[2], Yuma TANAKA[1], Daisuke YAMAMOTO[1], Tomoyuki NISHI[2], Daijiro UEDA[2], Mizuki MURAKAMI[2], Yoko YASUNO[3], Ai SEKIHARA[3], Kazuma FUKU[3], Tetsuro SHINADA[3], Kunio MIKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Niigata Univ., [3]Osaka-city Univ.)

テルペンは自然界で数万種が知られている化合物群であり、ホルモンや膜脂質、ビタミンや香料など、その役割は非常に多岐にわたる。全てのテルペンは、プレニル鎖を前駆体とした炭素結合の組み替えと、組み替えられた化学構造への他の化合物の付加で合成される。これまでにテルペンの炭素結合組み替えに関わる酵素としては、Class I 型と II 型の 2 種類が知られており、それぞれの型には特徴的なモチーフ配列が保存されている。私たちは最近 *Bacillus subtilis* から、これらモチーフ配列を持たない新型のテルペン合成酵素(TS)を発見した [1)]。この酵素は、炭素数 C_{25}～C_{35} のプレニル二リン酸から二リン酸を脱離させ、対応する炭素数のテルペン (large-terpene) に変換する酵素ファミリーを形成する [1-3)]。これまでに炭素数 C_{25} を超えるプレニル二リン酸の構造変換を触媒できる酵素はほとんど見つかっておらず、我々の見いだした新型テルペン合成酵素を含むファミリーに属する酵素群は、テルペンの構造多様性を大幅に拡張し、有用な化合物を見いだす手がかりになると強く期待できる。

この TS が属する酵素ファミリーの構造と機能を明らかにするため、我々はこのファミリーに属する TS-1 の結晶構造を 1.64 Å 分解能で決定した。TS-1 の構造には疎水性残基に富むクレフトが存在していた。このクレフトは非常に大きく、底の一部は入り口と反対側の酵素表面にまで貫通していた。クレフトの入り口付近には、アスパラギン酸に富むモチーフ配列が存在した。このモチーフ配列は、TS が属する酵素ファミリー内でほぼ完全に保存されている。Class I 型や II 型の酵素にも、アスパラギン酸に富むモチーフの存在は知られているが、TS-1 で見つかったモチーフ配列は、それらとは全く異なるものであった。このモチーフ中に存在するアスパラギン酸のアラニンへの置換により、酵素活性が消失することや、マグネシウムイオンを含まない溶液中では酵素活性が検出できないことから、このアスパラギン酸に富むモチーフ配列は、マグネシウムイオンを通して基質プレニル二リン酸の二リン酸部位を認識すると考えられる。

文献

1) Sato, T. *et al.* (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9734-7
2) Sato, T. *et al.* (2013) *ChemBioChem*, **14**, 822-5
3) Ueda, D. *et al.* (2015) *ChemBioChem*, **16**, 1371-7

crystal structure, terpene, isoprenoid

講演番号：3A17p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A17 会場

Large-terpene 合成酵素の酵素的諸性質の解析と部位特異的変異

Characterization and site-directed mutagenesis of large-terpene synthase

○菅原 啓[1]、西 智之[1]、小川 佳央[1]、高橋 宏忠[1]、上田 大次郎[1]、藤橋 雅宏[2]、三木 邦夫[2]、保野 陽子[3]、品田 哲郎[3]、佐藤 努[1] ([1]新潟大学、[2]京都大学、[3]大阪市立大学)
○Kei Sugawara[1], Tomoyuki Nisi[1], Kao Ogawa[1], Hirotada Takahasi[1], Daizirou Ueda[1], Masahiro Huzihasi[2], Kunio Miki[2], Youko Yasuno[3], Teturou Sinada[3], Tutomu Satou[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka City Univ.)

以前、我々は、*Bacillus* 属細菌のセスクアテルペン（C_{35}）の生合成研究から、新型のテルペン環化酵素（TS）を発見した[1)]。さらに、*B. clausii* の TS ホモログが非環状の large-terpene（セスタ/トリ/セスクアテルペン）合成酵素であることを同定し[2,3)]、TS ホモログが新しいテルペン合成酵素ファミリーであることを解明した。最近我々は TS ホモログの１つ（TS-1）の X 線結晶構造解析に成功し、このファミリーで初めて三次構造を明らかにした。TS-1 は C_{20}～C_{35} までのポリプレニルニリン酸（GGPP、GFPP、HexPP、HepPP）と反応しそれぞれ非環状の生成物を作り出すことも判明した。本研究では、TS-1 における酵素的諸性質の解析と部位特異的変異実験による生成物の変化について報告する。

TS-1 の酵素的諸性質の解析（pH、温度、二価金属イオン、Mg^{2+}濃度、DTT 濃度、NaCl 濃度）を行った。現在、C_{20}～C_{35} 基質に対する速度論解析を行っており合わせて報告する。

一方、我々は、納豆菌から枯草菌にはない Heptaprenol と新規セスクアテルペンと考えられる化合物 **1** を見いだしている[4)]。**1** は納豆菌 TS ホモログ（TS-2）の生成物であると予想されたため、TS-2 の塩基配列を確認したところ、アミノ酸配列で１か所だけ枯草菌 TS と異なっていることが判明した。TS にその変異を導入したところ、**1** を生成したことから、**1** は TS-2 生成物であることが示唆された。その箇所が生成物特異性に重要であることが分かったことから、TS-1 において相当する位置をアミノ酸置換し生成物を解析した結果、新規生成物 **2** を確認することができた。現在、**2** を単離・構造決定しており、合わせて報告する予定である。

【文献】

1) Sato, T., Yoshida, S., Hoshino, H., Tanno, M., Nakajima, M., Hoshino, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737, 2011.
2) Sato, T., Yamaga, H., Kashima, S., Murata, Y., Shinada, T., Nakano, C., Hoshino, T., *ChemBioChem*, 14 (7), 822-825, 2013.
3) Ueda, D., Yamaga, H., Murakami, M., Totsuka, Y., Shinada, T., Sato, T., *ChemBioChem*, 16, 1371-1377, 2015.
4) 高橋 宏忠・上田 大次郎・佐藤　努, 農芸化学会, *3C11p12,* 2017

terpene synthase, isoprenoid, terpenoid

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A17p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A17 会場

アセトニル基をもつノルイソプレノイド類の生合成：ビタミンKの非酵素的開裂
Biosynthesis of norisoprenoids with acetonyl group：nonenzymatic cleacage of vitamin K
○上田 大次郎[1]、松ヶ根 沙織[1]、岡本 渉[1]、橋本 昌征[2]、佐藤 努[1] ([1]新潟大学、[2]成功大分医所)
○DAIJIRO UEDA[1], SAORI MATSUGANE[1], WATARU OKAMOTO[1], MASAYUKI HASHIMOTO[2], TSUTOMU SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]National Cheng Kung Univ.)

最近、我々は *Bacillus* 属細菌からユニークなテルペノイドおよび生合成酵素を見いだしており、さらなる探索を行っている。その中でアセトニル基をもつノルイソプレノイド類（$C_5 \times n + C_3$）である C_{33} のファルネシルファルネシルアセトン（FFA）を天然物として初めて単離、同定した。この天然物ファミリーの中には、甲殻類ホルモンや昆虫フェロモンなどの生理活性物質も知られているが、生合成研究はほとんど行われていない。我々は、FFA の生合成経路の解明を目指すことにした。2016 年の本会[1)]において、FFA はメナキノン-7（MK-7）が活性酸素（スーパオキシドアニオン：$O_2^{-\cdot}$）によって開裂して非酵素的に生産されることを *in vitro* 実験、枯草菌破壊株を用いた *in vivo* 実験によって証明した。今回 *in vivo, in vitro* において $O_2^{-\cdot}$ によって非酵素的な反応が行われている証拠を増やすため、以下の実験を行った。

1）$O_2^{-\cdot}$ を分解する酵素（スーパーオキシドディスムターゼ：SOD）の遺伝子破壊株（Δ*sodA*）の脂質成分を分析したところ野生株よりも菌体あたりの FFA を多く生産した。そこに抗酸化物質であるシステインとグルタチオンを添加し、各々培養を行ったところ、菌体あたりの FFA 生産量が両者とも減少した。Δ*sodA* 内で発生した $O_2^{-\cdot}$ を抗酸化物質が消去することによって、生産される FFA 量が減ったと考えられる。

2）*In vitro* 実験で、MK-7 をけん化処理すると FFA が生産され、嫌気状態では FFA 生産率が減少する結果が得られていた[1)]。今回、抗酸化物質であるジブチルヒドロキシトルエンを添加し、けん化処理を行った結果、嫌気状態と同様に生産率が減少し、酸素が反応に関与する証拠をさらに得た。

3）2017 年の本会[2)]において、大腸菌中ではヘプタプレノールを FFA へ変換する経路が存在することが示唆された。今回、枯草菌では MK-7 が基質であることを明確にするため、ヘプタプレニル二リン酸合成酵素の遺伝子破壊株（Δ*HepS/T*）を作成し実験を行った。Δ*HepS/T* は FFA を生産しないのに対し、MK-7 を添加すると生産することから、MK-7 が FFA の前駆体であることが強く示唆された。

今回と 2016 年の結果[1)]を合わせて、枯草菌において FFA は $O_2^{-\cdot}$ によるビタミンK類（MK-7）の非酵素的開裂によって生合成されていることを提案したい。加えて、今回、フィロキンとメナキノン-4 をメナキノン生合成遺伝子破壊株に添加することによって、甲殻類ホルモンと昆虫フェロモンを生産することにも成功しており、合わせて報告する。1）農化（2B026）2016、2）農化（3C11p12）2017

terpenoids, menaquinone, reactive oxygen species

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A17p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A17 会場

大腸菌内における C_{25} アーキア膜脂質生合成経路の構築
Construction of C_{25} archaeal membrane lipid biosythetic pathway in *Escherichia coli*.
○吉田 稜、吉村 徹、邊見 久（名大院生命農）
○Ryo YOSHIDA, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

アーキアはバクテリア･真核生物と並ぶ第 3 のドメインを構成する生物群であり,その多くが高温,高塩濃度といった極限環境から単離されている．アーキアと他生物を分ける特徴の一つに膜脂質構造の違いが挙げられる．他生物の一般的な膜脂質の疎水部が直鎖脂肪酸であるのに対し，最も一般的なアーキア膜脂質の疎水部は炭素数 5 のイソプレン単位が 4 つ連なった C_{20} イソプレノイド鎖である．このアーキア特異的な膜脂質はアーキアが極限環境に生育できる要因の一つとして考えられている．また興味深いことにアーキアは種によって多様な構造の膜脂質を有し，超好熱菌や高度好塩菌などの一部のアーキアからはグリセロール骨格に完全還元された C_{25} イソプレノイドが結合した膜脂質が見つかっている．本研究では C_{25} イソプレノイドからなるアーキア膜脂質の生理的意義の解明を目的として，それらの生合成遺伝子を大腸菌に導入し，同種の脂質を有する大腸菌株の作出を試みた．C_{25} アーキア膜脂質の生合成においては，イソペンテニル二リン酸，ジメチルアリル二リン酸，およびジヒドロキシアセトンリン酸を前駆体とし，*sn*-グリセロール-1-リン酸脱水素酵素(G1PDH)，ゲラニルファルネシル二リン酸合成酵素(GFPS)，ゲラニルファルネシルグリセロールリン酸合成酵素(GFGPS)，ジゲラニルファルネシルグリセロールリン酸合成酵素(DGFGPS)によって中間体であるジゲラニルファルネシルグリセロールリン酸(DGFGP)が合成されると考えられている．その後，おそらくゲラニルファルネシルレダクターゼ(GFR)によってイソプレノイド鎖の二重結合が還元される．

我々はまず，DGFGP 生合成経路を大腸菌内に構築することを計画した．G1PDH と GFPS は既に機能解析が完了している．そこで本研究では GFGPS および DGFGPS をコードすると推定される遺伝子を超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* からクローニングし，大腸菌に発現させた組換えタンパク質を用いて機能解析を行った．その結果，それらのタンパク質は放射性基質を用いた *in vitro* の反応系において，それぞれ GFGPS 活性，DGFGPS 活性を示した．次に上記の 4 つの酵素の遺伝子を組み込んだベクターpBAD-C_{25}ALB4 を構築し，大腸菌 TOP10 株に導入した．この大腸菌株から抽出した脂質を LC/ESI-MS で分析したところ，極性頭部にグリセロールが付加されたジゲラニルファルネシルグリセロールホスホグリセロール(DGFGP-Gro)が検出された．この結果は，4 つのアーキア由来酵素によって合成された DGFGP が,大腸菌内在の酵素によって極性頭部の修飾を受けたことを示唆している.現在,pBAD-C_{25}ALB4 に GFR 遺伝子を加えた pBAD-C_{25}ALB5 の構築を進めている．

archaea, membrane lipid, isoprenoid

発表責任者：邊見久（hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A18a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A18 会場

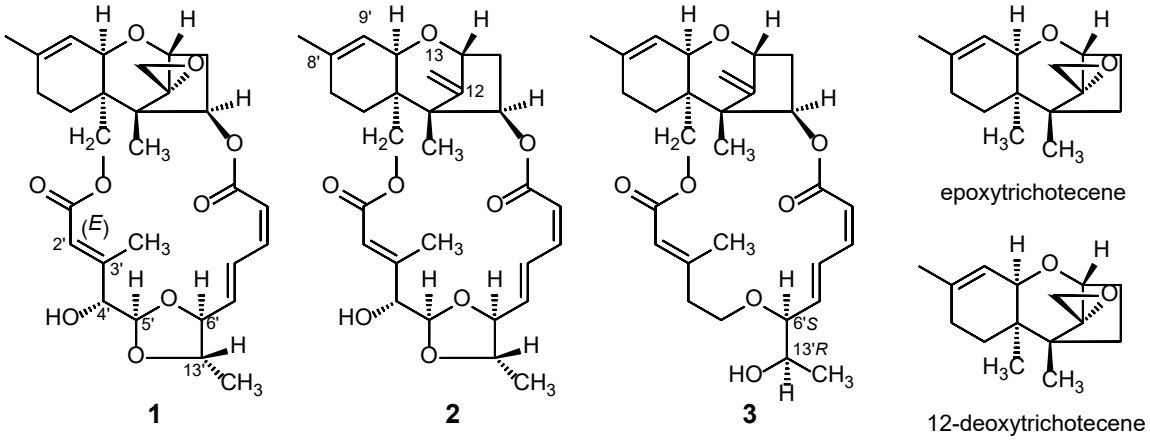
Calcarisporium arbuscular の生産する roridin 類について

Roridin derivation from Calcarisporium arbuscular

○松本 愛美、橋本 勝（弘大）
○Manami MATSUMOTO, Masaru HASIMOTO (Hirosaki Univ.)

Calcarisporium arbuscular 培養液から既知 roridin J (**1**)を単離した。**1** の NMR スペクトルは文献（Jarvis, *Tetrahedron* **2017,** *73*, 5430）と完全に一致したが、C2'C3'は文献とは異なり *E*-配置であることを見出した。さらに、不明であった C4, C5, C6, C13 位の立体化学を NOE および計算による配座解析などにより推定、X 線結晶解析により確認した。さらに培養液を探索したところ、C12,C13 位にエポキシドを持たない 12-deoxyroridin J (**2**)、12-deoxyepiisororidin E (**3**)を単離した。**2** のマクロリド部 ^{13}C 化学シフトは **1** のそれと酷似しており、本研究で修正した 2'*E* 配置を含めた他の不斉炭素も、**1** と同一の立体配置を確認した。roridin E には C6', C13'の立体中心に起因する 4 種のジアステレオマーが知られているが、マクロリド部 ^{13}C 化学シフトを比較することにより 6'*S*,13'*R* 配置と決定した。**2**, **3** の ECD スペクトルは、それぞれ roridin J, epiisororidin E のそれらと 220-300 nm 領域で良い一致を示し、その絶対配置を確認したが、いずれの場合も、通常の roridin 類では見られなかった負のコットン効果を 200 nm に観測した。DFT 法により真空紫外領域の ECD スペクトルを考察した結果、このコットン効果は、C8C9 及び C12C13 の二つの孤立二重結合間の負のキラルな捩れに基づく励起子相互作用の長波長側の負のコットン効果であると結論した。

12,13-Epoxytrichotecene 構築の後、多くの酵素が関与してマクロリド部が生合成されると明らかにされており、12-deoxytrichotecene が生合成基質になっているとは考えにくい。我々は、roridin J 或いは epiisororidin J が生合成された後に還元、エキソメチレンが形成されると考察した。



roridin, structure revision

講演番号：3A18a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A18 会場

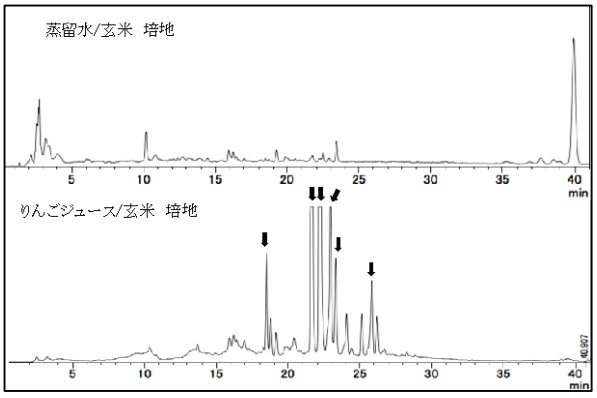
マングローブ植物由来糸状菌 *Bionectria ochroleuca* B5－2 株が生産するりんごジュース米培地により誘導される二次代謝産物について

New Secondary metabolites induced by apple juice rice medium produced by mangrove endophytic fungus *Bionectria ochroleuca* B5-2.

○鈴木 拓馬、網干 貴子、村山 哲也、小関 卓也、塩野 義人（山形大農）
○ Takuma SUZUKI, Takako ABOSHI, Tetsuya MURAYAMA, Takuya KOSEKI, Yoshihito SHIONO (Yamagata Univ.)

【背景】マングローブの植物群には、通常の陸上植物とは異なる多種多様な内生菌が存在していると考えられ、マングローブ植物由来の内生菌は豊富な天然生理活性物質の探索資源として注目されている。一般的に糸状菌は、その環境からくる様々な要因（温度、pH、明暗、化学物質 など）に適応しながら生育し、さらには二次代謝産物の生産を行っている。したがって、それら外的要因が糸状菌の物質生産を調節する要因となっていることが考えられ、逆に、培養条件の変化や環境ストレスを与えることにより、新たな二次代謝産物が誘導される。我々はこれまでに、培地の塩濃度に応答して誘導される物質を明らかにしてきた。そこで本研究では、新たに培養条件を変化させることにより、誘導される物質の単離を目的とし、培地に市販のりんごジュースを添加することにより、二次代謝産物の生産パターンが変化する菌株を選別し、その誘導される物質の探索を行った。

【方法および結果】採取したマングローブ植物サンプルより分離した糸状菌 100 株のうち、TLC 上で物質生産性が低い菌株を数種選別した。それらの菌株を蒸留水と玄米で調製した培地とりんごジュースと玄米で調製した二種類の培地で培養し、二次代謝産物生産パターンが変化する菌株を探索した。その結果、*Bionectria ochroleuca* B5−2 株の培養抽出物の TLC、HPLC 分析において、りんごジュース米培地により、誘導される物質が認められたことから、B5−2 株が生産する誘導物質を明らかにすることにした。B5−2 株をりんごジュースと玄米で調製した培地で 30 日間培養し、得られた酢酸エチル抽出物を TLC 上のスポットを指標に各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、化合物 **1** - **5** を単離した。各種機器分析を用いた構造解析の結果、**1** は高分解能マススペクトルより、分子式を $C_{14}H_{18}O_4$ と決定され、**1** の ^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータより tetronic acid 関連化合物として知られる既知の化合物の vertinolide と同定した。化合物 **2** は ^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータより **1** の新規類縁化合物であると同定した。また **3 – 5** も同様に構造解析を行った結果、新規脂肪酸関連化合物であることがわかった。なお、今回得られた化合物 **1 – 5** の立体配置、生理活性試験は現在解析中である。



異なる二種類の培地で培養した
B5-2 株のメタノール抽出物の比較

Mangrove plant, Endophytic fungi, Secondary metabolite

発表責任者：塩野義人（yshiono@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3A18a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A18 会場

微生物を用いたプロシアニジン分解・代謝物の機能性評価

Evaluation of functional properties of procyanidin biodegradation products

○北岡 望[1]、西村 拓哉[1]、小堀 亮[1]、八上 修一[1]、橋本 誠也[2]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工・先端、[2]大阪電通大・工・環境)
○Nozomi KITAOKA[1], Takuya Nishimura[1], Ryo Kobori[1], Syuiti Yagami[1], Seiya Hasimoto[2], Akiko Saito[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU)

【目的】

Proanthocyanidin (PA)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物であり、その中でも、(+)-catechin (**1**)や(–)-epicatechin (**2**)などの B 環に水酸基を 2 つ有する flavan-3-ol 誘導体が重合した構造を procyanidin と呼ぶ。PA は、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。また、日々大量に摂取する化合物群であり食経験が豊富なであることから、健康機能性食品として利用・応用しやすい。しかし、これらの化合物は、天然から複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構はほとんど解明されていない。そこで我々は、様々な立体を持つ PA や flavan-3-ol 誘導体の合成研究を行い、詳細な構造-活性相関研究を進めてきた。その結果、フェノール性水酸基の数や、立体の違い、修飾の有無などにより大きく活性が異なることを明らかにした。また、2014 年本大会において、長鎖のオリゴマーよりも短鎖(3~4 量体)の機能性が高い可能性を報告している [1)]。これらの結果を受けて、我々は、より効率的な短鎖のオリゴマー生産方法の検討を進め、PA 含有量が高い植物から分離した菌等を用いて分解・代謝研究を行ったので報告する。

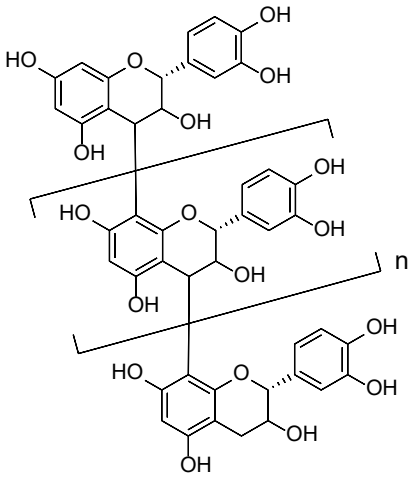
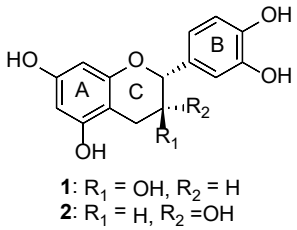


Figure 1. Procyanidin の一般構造

【方法・結果】

PA などのポリフェノール成分が多く含まれる植物から酵母の分離を行った。分離した酵母をスクリーニングし、PA 存在下でも生育が阻害されにくい菌を選抜した。それらの菌を用いて、procyanidin の分解・代謝を試みたところ、数種類の条件下で分解が進行した。本報告では、分解・代謝物の分析結果、及び、それらの機能性評価として、ラジカル消去活性、抗菌活性等について報告する。

(1) 濱田義知 他、日本農芸化学会 (2014)。



1: R_1 = OH, R_2 = H
2: R_1 = H, R_2 =OH

Figure 2. Procyanidin の構成成分

Procyanidin, Biodegradation produc, Biological activity

発表責任者：齊藤安喜子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3A18a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A18 会場

Paenibacillus sp. PS-1 の生産するアフラトキシン生産阻害物質
Aflatoxin production inhibitors produced by *Paenibacillus* sp. PS-1
○楊 笑然[1]、古川 智宏[1]、飯村 九林[2]、高山 誠司[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院農生科、[2]日女大家政)
○ Xiaoran YANG[1], Tomohiro FURUKAWA[1], Kurin IIMURA[2], Seiji TAKAYAMA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Japan Women's Univ.)

【目的】
アフラトキシンとは、*Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* により生産されるカビ毒（マイコトキシン）の一種であり、強力な発がん性を持つ。アフラトキシン汚染は熱帯、亜熱帯地方を中心に世界中で見られ、大きな経済的被害とヒトや家畜への健康被害を起こしている。中国においても、汚泥より精製した食用油（地溝油）に高濃度のアフラトキシンが含まれていた事件により食品安全当局による取り締まりが強化されることとなった。このような被害を減じるために、アフラトキシン汚染の防除策の確立が急がれている。アフラトキシンは安定性が高く、汚染された農作物を無害化することは困難である。菌の生育そのものを阻害する薬剤は、アフラトキシン産生菌の薬剤に対する生存適応の結果として耐性菌の早期蔓延を招く可能性が無視できない。そのため、カビの生育を阻害することなくアフラトキシン生産を阻害する方策が求められている。当研究室では、菌体の生育には影響せずアフラトキシン生産を特異的に阻害する微生物、及び微生物の生産する代謝産物に着目し探索を行っている。本研究ではアフラトキシン汚染防除に有用な土壌細菌を探索し、得られた細菌が生産するアフラトキシン生産阻害物質の同定を試みた。

【方法および結果】
東京大学弥生キャンパスの土壌から、ピーナッツ殻上で生育可能な菌株を分離した。各菌株について*A.parasiticus*との共培養を行った結果、*A.parasiticus*の生育を阻害せず強くアフラトキシン生産を阻害する菌株が見出され、16S rDNA系統解析から*Paenibacillus* 属細菌（PS-1と命名）と同定された。 PS-1の菌体メタノール抽出物にアフラトキシン生産阻害活性が確認され、抽出物をメタノール、クロロホルム系によるシリカゲルクロマトグラフィーにより分画したところ、メタノール50%画分に活性が回収された。当該画分の濃縮物をメタノールに溶解後、逆相HPLCによる分離を行い、アフラトキシン生産阻害活性を有するピークを2つ確認した。各ピークから分取した化合物はともにニンヒドリン反応陽性であった。現在MSおよびNMRによる分析を行い、活性化合物の同定を試みている。

aflatoxin, *Paenibacillus*, inhibitor

発表責任者：楊　笑然（liliumelfin@gmail.com）

講演番号：3A18a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A18 会場

アフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の引き起こす Clp プロテアーゼの異常活性
Abnormal activity of Clp protease induced by aflatoxin production inhibitor dioctatin
○古川 智宏[1]、片山 秀和[2]、村瀬 浩司[1]、根岸 瑠美[3]、鈴木 道生[1]、高山 誠司[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院農生科、[2]東海大工、[3]東大分生研)
○Tomohiro FURUKAWA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Kohji MURASE[1], Rumi NEGISHI[3], Michio SUZUKI[1], Seiji TAKAYAMA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]The Univ. of Tokyo IMCB)

【目的】*Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* の生産するアフラトキシン (AF) による農作物の汚染は深刻な問題であり、世界全体で約 45 億人が潜在的な健康リスクに曝されているとの見積もりもある。実用的な AF 汚染防除法の開発が望まれているが、AF 生産菌に対し効果的な殺菌剤は実用化されておらず、また殺菌剤の施用には耐性菌蔓延の懸念がつきまとう。当研究室では、早期耐性菌蔓延の懸念が少ない AF 生産特異的抑制剤に着目し研究を行っており、放線菌 SA-2581 株の生産する dioctatin A および誘導体の dioctatin に強い AF 生産阻害活性を見出している。これまでの研究で、dioctatin 結合タンパク質としてミトコンドリアの Clp プロテアーゼ活性サブユニット (ClpP) を同定し、dioctatin によって ClpP のプロテアーゼ活性が増幅され、ミトコンドリア内で呼吸鎖複合体やクエン酸回路の酵素の分解を引き起こしていることを示唆した(古川ら、2017 年度大会)。dioctatin の作用機序の解明は、薬剤の実用化のみならず AF 生産制御機構の理解にも繋がると期待される。本研究では、dioctatin が ClpP に及ぼす作用を詳細に解析し、AF 生産阻害との関連を調べた。
【方法および結果】dioctatin の結合タンパク質として同定された ClpP は、14 量体のシリンダー状構造を形成して活性部位をその内部空間に秘匿していると考えられ、ClpP の構造を変化させる分子シャペロン ClpX の制御なしではタンパク質を分解できない。His タグ融合タンパク質として発現したのち、タグを切断した組換え *A. flavus* ClpP (AfClpP) は、組換え *A. flavus* ClpX (AfClpX) の非存在下ではβ-カゼインを全く分解しなかった。しかしながら、dioctatin を添加すると AfClpX 非存在下でも AfClpP 単独でβ-カゼインの分解が可能となることが明らかとなり、dioctatin は AfClpP の立体構造を変化させると考えられた。一方、FLAG タグ融合ヒト ClpP に対してはこのような活性は確認されず、ヒトに対する毒性はないことが示唆される。現在、dioctatin と AfClpP の共結晶の構造解析を試みている。次に、dioctatin 添加により生じる代謝関連遺伝子の発現変動を調べたところ、解糖系およびエタノール発酵関連酵素遺伝子の発現が増大していた一方、アセトアルデヒドから AF の原料となるアセチル CoA に至る酵素遺伝子群の発現が減少していた。ここから、dioctatin は AfClpP によるミトコンドリアタンパク質の異常分解を誘導することで、ミトコンドリア不良タンパク質応答や代謝物質生産の状態を変動させ、AF 生産の原料物質の減少、および AF 生産量の減少を招くと考えられた。
【謝辞】本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われたものである。

Aspergillus flavus, dioctatin, Clp protease

発表責任者：古川智宏（a-furukawa@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A18a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A18 会場

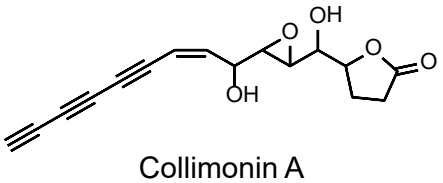
真菌資化性のグラム陰性細菌 *Collimonas fungivorans* Ter331 株が産生する不安定ポリイン類の構造決定と生物活性

Structure elucidation and biological activities of unstable polyynes from the fungus-feeding bacterium *Collimonas fungivorans* Ter331

○甲斐 建次、十亀 麻衣（阪府大院・生命環境）
○Kenji KAI, Mai SOGAME (Osaka Pref. Univ.)

【目的】*Collimonas fungivorans* Ter331 株は，*Aspergillus niger* などの真菌を資化する細菌として発見された。このユニークな特性には，*C. fungivorans* が産生する抗真菌化合物とキチナーゼが関与することが示唆されている。また，変異株のスクリーニング実験とゲノム解析から，前者の産生に関わる *col* 遺伝子クラスターが見出され，それらが連続した炭素−炭素三重結合を有するポリイン類を産生することが予想されている。このユニークな細菌−真菌相互作用を探る上でポリイン類（collimonin 類と名付けた）は重要な化合物群であるが，それらの化学構造は明らかにされていない。近年，ポリイン類の産生に関わると予想される生合成遺伝子クラスターが，いくつかの細菌ゲノムから発見されている。しかし，末端アルキンから始まる共役ポリイン化合物は極めて不安定であるため，単離・構造決定されたのは数例のみである。よって，ポリイン類を安定に単離し，構造決定への道筋を確立することができれば，天然物化学の発展にも寄与することが期待できる。そこで本研究では，*C. fungivorans* が持つユニークな真菌資化戦略の化学的な解明と新規ポリイン類の同定を目標として，本菌が産生する collimonin 類の単離・構造決定と生物活性評価を進めた。

【方法・結果】Ter331 株の培養物を酢酸エチルで抽出し，それを *A. niger* に処理すると顕著な生育阻害が認められた。さらに，抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーで分画したところ, 1 つの画分に強い抗真菌活性が観察された。本画分には collimonin A−D が含まれており，これらが本菌の抗真菌性に寄与することが予想された。光と室温以上の高温，エバポレーターによる乾固を避け，構造決定に足る量の collimonin 類を単離した。各種 NMR と MS により，これらの平面構造を決定したところ，いずれも ene-triyne 構造と複数のオキシメチンを有することが分かった（右上図）。Collimonin C と D については，水素添加とメチル化により構造を単純化した diol 化合物へと導き，別途調製した合成標品との HPLC での保持時間を比較することで，それぞれの絶対立体配置を決定した。Collimonin A と B はベンジルアジドとのクリック反応により構造安定化を実行した後，結晶構造解析により絶対立体配置の決定を検討している。単離した collimonin 類は，*A. niger* に対して抗真菌活性を示した。また興味深いことに，collimonin B は *A. niger* 菌糸内に黄色色素の蓄積を顕著に誘導した。



Collimonin A

polyyne, collimonin, antifungal activity

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A18a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A18 会場

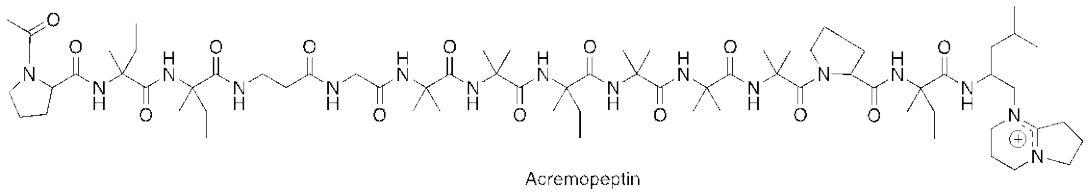
新規ペプタイボール acremopeptin に関する研究

Study of a new peptaibol, acremopeptin.

○飯島 正富[1]、雨宮 昌秀[1]、澤 竜一[1]、久保田 由美子[1]、国定 孝雄[2]、百瀬 功[1]、川田 学[1]、柴﨑 正勝[1] ([1]微化研、[2]Meiji Seika ファルマ)
○ Masatomi IIJIMA[1], Masahide AMEMIYA[1], Ryuichi SAWA[1], Yumiko KUBOTA[1], Takao KUNISADA[2], Isao MOMOSE[1], Manabu KAWADA[1], Masakatsu SHIBASAKI[1] ([1]Inst. of Microbial Chemistry, [2]Meiji Seika Pharma Ltd.)

IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein, アポトーシス阻害因子) は, 活性化カスパーゼ (Caspase-3, Caspase-7, Caspase-9 など) に結合し, カスパーゼを不活性化することによりアポトーシスを強力に抑制するタンパク質である。多くのがん細胞では種々の要因によりこれらのタンパク質が過剰に産生され、がん細胞の異常増殖に関与していると考えられる。従って、IAP の制御はがん細胞の増殖抑制に繋がることからがん化学療法の分子標的の 1 つと考えられている。我々はがん細胞の IAP を標的とし、がん細胞にアポトーシスを亢進させる化合物の探索を微生物培養液より行った。その結果、かびの固体培養抽出液より新規化合物 acremopeptin を見出したので報告する。

マウス RAW264.7 細胞に対してドキソルビシンのアポトーシス誘導を亢進させる活性を指標に微生物培養液より探索し、目的活性を示すブロスを得た。それらの中より XIAP と survivin の産生をウェスタンブロットで調べ、抑制効果がみられたブロスについて活性物質を単離精製した。生産菌であるカビ *Acremonium* sp. PF1450 株の固体抽出培養液より HP-20, HPLC 等により新規化合物 acremopeptin および既知化合物 adenopeptin を単離した。高分解能 ESIMS および各種 NMR 解析より acremopeptin は adenopeptin に類似した構造を持つ分子式 $C_{70}H_{121}N_{16}O_{14}$ の化合物で、adenopeptin を構成するアミノ酸の 1 つピペコリン酸がプロリンで置き換わった構造と決定した。またペプチドを構成するアミノ酸であるプロリンとイソバリンの立体構造は新マーフィー法により明らかにした。Acremopeptin はがん細胞内の XIAP および survivin のタンパクレベルを減少させたが、mRNA レベルの減少はみられなかった。また、がん細胞株に対して増殖抑制効果を示した。Acremopeptin の作用機序については現在検討中である。



Acremopeptin

peptaibol, IAP, *Acremonium*

発表責任者：飯島正富（iijimam@bikaken.or.jp）

講演番号：3A18a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A18 会場

微生物二次代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索

Search of the antimalarial compounds from microbial secondary metabolite

○森 菜月[1]、深澤 航[1]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、石山 亜紀[1,2]、穂苅 玲[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大学大学院感染制御科学府、[2]北里大学北里生命科学研究所)
○Natsuki MORI[1], Wataru FUKASAWA[1], MASATO IWATSUKI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Atuko MATSUMOTO[1,2], Aki ISHIYAMA[1,2], Rei HOKARI[2], Satoshi OOMURA[2], Kazurou SHIOMI[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato institute for Life Sciences, Kitasato University)

【背景と目的】マラリアは発展途上国を中心に流行している寄生虫感染症で、年間 2 億人が罹患し、40 万人以上が死亡している。マラリアは三大感染症の一つとして重要視されているが、薬剤耐性原虫の出現などの問題があることから新たな作用機序を有する薬剤の開発が求められている。そこで演者は治療薬開発のためのリード化合物の発見を目的として、マラリアの中でも最も致死率の高い熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害活性を指標に、微生物培養液のスクリーニングを行った。

【方法】本スクリーニングは熱帯熱マラリア原虫の多剤耐性 K1 株およびヒト胎児胚由来正常繊維芽細胞 MRC-5 細胞を用いて行った[1]。1 次スクリーニングでは微生物培養液 10 μL でマラリア原虫の増殖を 90%以上阻害するサンプルを選択し、2 次スクリーニングでは微生物培養液 1 μL でもマラリア原虫の増殖を 50%以上阻害するサンプルを選択した。更に 3 次スクリーニングとして MRC-5 細胞に対する細胞毒性との選択性を 5 倍以上示すサンプルを選択した。選択された株については再培養を行った。培養で活性の再現性が得られた株については大量培養を実施し、マラリア原虫増殖阻害活性を指標に活性物質を精製した。

【結果と考察】微生物培養液 3,960 サンプルについてスクリーニングした結果、3 次通過サンプルを 18 見出した。この内、演者は本系の frequent hit が LC-MS で検出されなかった糸状菌 *Tolypocladium* 属 FKI-7981 株について活性物質の精製を行った。まず本株を小スケール（米 500 g を主成分とする固体培地）で再培養した結果、活性の再現性が得られた。そこで大量培養物（米 5 kg 分）の酢酸エチル抽出物についてシリカゲル樹脂および ODS 樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで精製を行った。精製挙動から活性物質は脂溶性が高いことが明らかとなった。

更に得られた活性画分について LH-20 樹脂を用いてカラムクロマトグラフィーを行った結果、弱いマラリア活性を持つ Fusaristatin A[2]（IC_{50} = 20.2 μM）および活性本体である Acremostatin B[3]（IC_{50} = 69.0 nM）を取得した。いずれの化合物の抗マラリア原虫活性も初の知見であった。

【参考文献】

1) Otoguro, K. *et al. J. Antibiot.* **54**, 658–663 (2001)
2) Shiono, Y. *et al., J. Antibiot.* **60**, 309–316 (2007)
3) Degenkolb, T. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem*, **66**, 883–886 (2002)

Malaria

発表責任者：森　菜月（mi17019@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3A18a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A18 会場

薬剤感受性出芽酵母を用いた抗真菌薬シード化合物の探索

Search for antifungal seed compounds using a multi-drug sensitive budding yeast

○坂井 克行[1]、廣瀬 友靖[1,2]、岩月 正人[1,2]、知念 拓実[3]、木村 徹[1]、須賀 拓弥[1,2]、野中 健一[1,2]、中島 琢自[1,2]、砂塚 敏明[1,2]、臼井 健郎[3]、浅見 行弘[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]筑波大生命環境科学)

○Katsuyuki SAKAI[1], Tomoyasu HIROSE[1,2], Masato IWATSUKI[1,2], Takumi CHINEN[3], Toru KIMURA[1], Takuya SUGA[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Takuji NAKASHIMA[1,2], Toshiaki SUNAZUKA[1,2], Takeo USUI[3], Yukihiro ASAMI[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Kitasato Univ. graduate school of infection control sciences, [2]Kitasato Univ. kitasato institute for life sciences, [3]Tsukuba Univ. graduate school of life and environmental sciences)

【背景と目的】出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は薬剤のスクリーニング、ターゲットの同定や生物活性物質の評価を含むケミカルバイオロジー研究で広く使用されている。しかしながら、*S. cerevisiae* は低い薬剤透過性、及び細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの亢進により高い薬剤耐性を示し、化合物の探索や解析を困難にしている。したがって、薬剤感受性を有した *S. cerevisiae* を利用すればこれまでにスクリーニングされてこなかった化合物を探索することが可能になると考えられる。そこで、薬剤排出ポンプである ATP binding cassette (ABC) transporter の発現に関わる 12 個の遺伝子を破壊し、さらに薬剤膜透過性に関わる ergosterol 合成遺伝子を誘導発現型にした薬剤超感受性の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6[1] を利用して、微生物二次代謝産物から新しい抗真菌薬シード化合物を探索することを目的に研究を行った。

【方法】ABC transporter に関わる遺伝子を 4 個破壊した *S. cerevisiae* BY25929 (4 遺伝子破壊株) と 12 個破壊した *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 (12 遺伝子破壊株) を利用しペーパーディスク法により微生物培養液からスクリーニングを行った。12 遺伝子破壊株にのみ阻止円を形成するサンプルを選抜し、選抜したサンプルについて生産菌の培養及び精製、単離、構造解析を行った。

【結果と考察】上記の方法で糸状菌及び放線菌培養液計 4,656 サンプルのスクリーニングを行い、スクリーニング通過サンプルを 2 サンプル見出した。スクリーニング通過サンプルの糸状菌 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物より新規化合物の pestynol (Fig. 1) を 33 mg 取得した。Pestynol の平面構造は高分解能 ESI-MS 及び各種 NMR により決定した。続いて、pestynol のシクロヘキセン環内の絶対立体配置を改良モッシャー法によりすべて *R* 体であると決定した。Pestynol の抗菌活性評価はペーパーディスク法で行い、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマ、酵母及び糸状菌に対して行った。Pestynol は複数のグラム陽性菌及び 12 遺伝子破壊株、ムコールに対して抗菌活性を示した。また、12 遺伝子破壊株の親株である *S. cerevisiae* BY4741 株に対して抗菌活性を示さなかったことより、薬剤排出機構を破壊した出芽酵母である 12 遺伝子破壊株を用いることで初めて取得することができた。

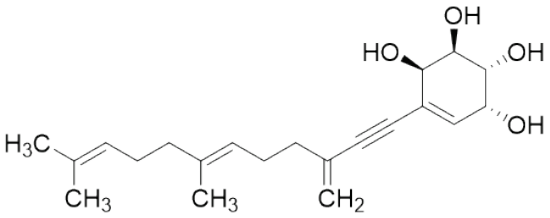


Fig. 1 Pestynolの化学構造

1) Chinen, T., Nagumo, Y. & Usui, T. *J. Gen. Appl. Microbiol*. **60**, 160–162 (2014)

farnesylcyclohexenetetraol, ATP-binding cassette transporter, multi-drug sensitive budding yeast

講演番号：3A18a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A18 会場

微生物の産生するアルベカシン耐性を克服する活性物質の探索

Search for circumventors of arbekacin resistance from microbial culture broth

○江口 修平[1]、椎名 真夕[1]、本庄 雅子[2]、岩月 正人[1,2]、浅見 行弘[1,2]、垣内 力[3]、松井 秀仁[2]、須賀 拓弥[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、花木 秀明[2]、砂塚 敏明[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研、[3]東大・院薬・免疫・微生物）

○ Shuhei EGUCHI[1], Mayu SHIINA[1], Masako HONSHO[2], Masato IWATSUKI[1,2], Yukihiro ASAMI[1,2], Chikara KAITO[3], Hidehito MATSUI[2], Takuya SUGA[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Hideaki HANAKI[2], Toshiaki SUNAZUKA[2], Satoshi ŌMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, [3]Laboratory for Immunology and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

【背景と目的】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は、ほとんどの国で感染の報告がされ院内感染型 MRSA、市中感染型 MRSA が大きな問題となっている。医療現場においては新しい薬剤耐性を獲得した臨床分離ダプトマイシン耐性 MRSA 株やテイコプラニン低感受性 MRSA 株が出現し、脅威となっている。特に日本で使用されているアルベカシン（ABK）は耐性菌の持つ二機能酵素の働きによって ABK の化学構造の 6′位をアセチル化及び 2″位をリン酸化されることで抗菌活性を失うことが知られている。本研究では二機能酵素により ABK 耐性を獲得した形質転換株を使って ABK 耐性を克服する化合物を得ることを目的として、微生物培養液を用いてスクリーニングを行った。

【方法】

1st screening では、二機能酵素を発現させた ABK 耐性を獲得した黄色ブドウ球菌 RN4220/ pND50-*aac(6')-Ie/aph(2")-Ia* 株を用いた。1 μg/mL ABK 含有寒天培地と ABK 非含有寒天培地を作製し、両寒天培地を用いてペーパーディスク法によるアッセイを行った。ABK 含有寒天培地選択的に阻止円を形成するものは、ABK 耐性を克服したものとして 1st screening 通過とした。2nd screening では 1st screening で使用した形質転換株のコントロール株である黄色ブドウ球菌 RN4220/pND50 株を用いて 1st screening と同様の操作を行った。0.25 μg/mL ABK 含有・非含有両方の寒天培地に阻止円を形成しなかったサンプルを 2nd screening 通過とした。3rd screening では、2nd screening 通過サンプルについて、二機能酵素阻害アッセイを行った。アセチル化阻害またはリン酸化阻害を示したサンプルを 3rd screening 通過とした。

【結果と考察】

微生物培養液 7,782 サンプルをスクリーニングし、放線菌 5 株、糸状菌 2 株のスクリーニング通過株を得た。このうち糸状菌 FKJ-0211 株を再培養し、活性物質を精製した。各種機器分析により活性物質を linoleic acid と同定した。Linoleic acid の生物活性評価を行った結果、二機能酵素阻害アッセイにおいてリン酸化及びアセチル化を 0.2 μg/mL で阻害していることが分かった。また、黄色ブドウ球菌 RN4220/ pND50-*aac(6')-Ie/aph(2")-Ia* 株では 125 倍の選択性を示したが、黄色ブドウ球菌 RN4220/pND50 株でも 50 倍の選択性を示した。以上のことより linoleic acid は ABK 耐性克服活性を確かに示しているが、二機能酵素を特異的に阻害しているのではないと考えられる。

bifunctional enzyme, MRSA, Arbekacin

講演番号：3A18a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A18 会場

新規スピロキシミシン類縁体 17T223A の構造と生物活性
Novel spiroximicin antibiotic family 17T223A, structure and bioactivities
○菰田 俊一[1]、鈴木 眞依[1]、桑原 明[1]、武田 蛍[1]、竹中 慶香[1]、山本 希[1]、小関 良卓[2]([1]宮城大　食産業、[2]東北大院　多元研)
○Toshikazu Komoda[1], Mai Suzuki[1], Akari Kuwabara[1], Hotaru Takeda[1], Yoshika Takenaka[1], Nozomi Yamamoto[1], Yoshitaka Koseki[2] ([1]Miyagi Univ., [2]Tohoku Univ.)

[目的]
放線菌は、様々な二次代謝物を生産することが知られており、従来から生理活性物質の探索源として利用されてきた。本研究では、枯草菌に対する抗菌活性を指標にしながら、放線菌の代謝産物中に新たな機能性成分を見出し、その化学構造を明らかにすること、また、見出した成分の持つ生理機能を明らかにすることを目的をした。

[方法および結果、考察]
はじめに、仙台市内を中心として各地より土壌から放線菌を単離し、ここから活性菌を選抜することとした。採取した土壌サンプルを、平板培地に塗布し、約 1 週間程度の静置培養を行った。培養後、平板培地上に生育した放線菌を斜面培地に移植し、検索対象の放線菌とした。単離された放線菌は試験管による培養を行い、その培養ろ液の抗菌性をペーパーディスク法により評価した。約 200 の放線菌をいくつかの培地にて培養した結果、17T223 株の培養ろ液に枯草菌に対する抗菌作用があることがわかった。そこで、このこの放線菌 17T223 株を、次の大量培養に供することとした。グルコース、酵母エキスおよび市販の「和風だしの素」を含む培地中で、回転培養により、7 日間の培養を行った後、ろ液(4.8L)をダイアイオン HP-20 に吸着後、メタノール溶出画分を得た。続いて、この画分をシリカゲルカラムクロマト、分取 HPLC 法にて精製し、活性物質 17T223A(**1**)および 17T223B(**2**)をそれぞれ 60 mg および 100 mg 得た。**1** および **2** の分子式は高分解能質量分析により得られ、各々$C_{22}H_{22}O_{10}$、$C_{22}H_{20}O_9$ であることがわかった。また、これら両物質は、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR および各種二次元 NMR の測定において、安定した測定結果を得られなかったことから、はじめに TMS-ジアゾメタンにより誘導化を行い解析することとした。誘導化の結果、**1** では 1 か所、**2** では 2 か所にメチル基が導入されたことがわかった。解析の結果、はじめに **2** の平面構造が示された。**2** の平面構造は、既知の抗生物質 spiroximicin の平面構造と一致した。**1** の平面構造は、**2** とよく似ていたが、**2** の構造にあるエポキシドが開環し、ジオール化した新規 spiroximicin 類縁体であると推定した。spiroximicin には、MRSA 等に対する抗菌活性が知られているが、現在、**1** および **2** の抗菌活性、その他の生物活性について評価を行っている。また、立体化学の解析についても検討を進めている。

spiroximicin, Streptomyces sp., NMR

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：3A18a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A18 会場

LC/QTOF MS によるパリトキシン新規類縁体オストレオシン-A の微量迅速構造解析

Structural elucidation of ostreocin-A, a new palytoxin analog produced by the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis* using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry

○寺島 健仁[1]、内田 秀明[2]、阿部 尚樹[3]、安元 健[4] ([1]東農大院・食品栄養、[2]アジレント・テクノロジー、[3]東農大・応生、[4]日本食品分析センター)
○Takehito TERAJIMA[1], Hideaki UCHIDA[2], Naoki ABE[3], Takeshi YASUMOTO[4] ([1]Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Agilent Technologies Japan, Ltd., [3]Dept. of Nutri. Sci. and Food Safety, Faculty of Appl. Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric., [4]Japan Food Research Laboratories)

【背景・目的】渦鞭毛藻 *Ostreopsis siamensis* が生産するオストレオシン類は、パリトキシン(PLTX; $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$)の類縁体で、巨大で複雑な構造を持つ海産有毒物質である。その中で、オストレオシン-D (OSTD)は NMR と FAB-CID-MS/MS により詳細に構造が明らかにされ、また、オストレオシン-B (OSTB)は LC/QTOF MS により平面構造を決定した。しかし、未だ構造未決定なオストレオシン類は多数存在しており、構造の解明は有機化学的に興味深い。さらに、化学構造の差異により毒性に大差が出ることから、構造情報は毒性監視には必須であり、微量で迅速に構造情報が得られる分析手法の開発は、保健・環境・食品衛生の分野からも注目される。

今回、LC/QTOF MS 手法を使用し、すでに構造が明らかにされた OSTD 及び OSTB をリファレンスとすることで、わずか 400 ng の試料量から、微量オストレオシン類のオストレオシン-A (OSTA)の構造解析を行い、平面構造を推定できたので報告する。

【方法・結果】渦鞭毛藻 *O. siamensis* は沖縄県阿嘉島より採取されたクローン株を使用し、OSTA の精製は既報[1)]に従い行った。HPLC は Agilent 社製 Infinity 1260 に逆相系 C18 カラムを付け、移動相は 0.01%酢酸水溶液とアセトニトリルでグラジエント分析した。MS は Agilent 社製 6530 QTOF に Dual spray AJS ESI を接続し、正/負イオンモードで測定した。

初めに、MS モードで測定を行い、OSTA の分子式は $C_{127}H_{219}N_3O_{54}$ と確認できた。これは、OSTD より酸素原子 1 個分多く、OSTB と同一であった。続いて、MS/MS モードにて測定を行った。プリカーサーイオンにはシンプルな$[M+H]^+$、$[M-H]^-$を選択した。OSTA より得られたプロダクトイオンスペクトルは、OSTD 及び OSTB のスペクトルパターンと非常に類似していたので、スペクトルを比較することでイオンの帰属を試みた。負イオン MS/MS モード測定結果から、OSTD と比較し C8'-C48 は同一であり、C49 以降に構造変化があると推定した。正イオン MS/MS モード測定より得られたフラグメントは、負イオンモードの結果を支持していたが、C79-C93 に相当するフラグメントに差異が認められたので、この部分に構造変化があると推測した。差異が認められたフラグメントを慎重に帰属したところ、C82 に水酸基が置換している構造が妥当であり、OSTA は 42,82-dihydroxy-3, 26-didemethyl-19,44-dideoxypalytoxin (82-hydroxy OSTD)と推定した。現在は、*O. siamensis* が生産する構造未決定なオストレオシン類の構造解析や藻体粗抽出物からの新奇な類縁体発見の可能性もあり、検討を進めている。(参考文献; 1 T. Ukena et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2001, **65**, 2585-2588)

palytoxin analog, LC/QTOF MS, 82-hydroxyostreocin-D

発表責任者：寺島健仁（45216001@nodai.ac.jp）

講演番号：3A18a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A18 会場

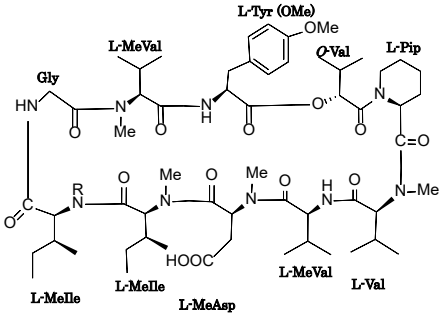
Clavariopsins C-H, antifungal cyclic depsipeptides from an aquatic hyphomycete

○Thin Wut SOE, Chunguang HAN, Yuki SAWAKI, Tomohiko TOMURA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

[Objective] Aquatic hyphomycetes are fungi occurring mainly in lotic fresh waters. Since chemical investigation has not been performed very well due to the difficulty of culture, they could be a potential source for novel natural products. We previously isolated two antifungal cyclic depsipeptides calvariopsins A and B from the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatia*[1]. Our recent investigation of the extract led to the isolation of 6 new clavariopsin analogs. We investigated their structure analysis and biological evaluation.

[Method] The culture broths (150×100 flasks) were extracted with acetone, and the extract was partitioned between EtOAc and H_2O. The EtOAc fraction was separated by silica gel column ($CHCl_3$-MeOH), then cyclic peptide fractions were purified by preparative HPLC. The structures were elucidated by NMR and MS analysis. Amino acids were confirmed by the advanced Marfey's method and chiral HPLC analysis. Biological activity of the isolated peptides was evaluated for 6 fungi by paper disk diffusion assay and expressed as minimum inhibition dose (μg/disk).

[Results and Discussion] Six new clavariopsins (C~H) were obtained together with the known clavariopsins A and B. Clavariopsin C was determined as shown in figure and others are different in N-methylation position and one amino acid moiety. Most clavariopsins showed growth inhibition against agriculturally important fungi: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Magnaporthe oryzae* and *Colletotrichum orbicular*. Especially, clavariopsins A, C, D, E, F, and G (MID = 0.1 μg/disk), B (MID = 0.3 μg/disk) and H (MID = 1 μg/disk) inhibited *B.cinerea* (Haiirokabibyo). Furthermore, we are evaluating cytotoxicity of the isolated compounds.



R= Me, clavariopsin A

R= H, clavariopsin C

[Acknowledgement] We thank Dr. Ryosuke Fudou and Kenichi Kaida (Ajinomoto Co., Inc.) for culturing and extracting the fungi.

[Reference] [1] Suzuki, Y. *et al. J. Antibiot*. *54*, 22-28 (2001).

aquatic hyphomycete, cyclic depsipeptide, antifungal

講演番号：3A18a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A18 会場

クロイソカイメン共生菌が生産する新規有毒二次代謝産物の構造決定

Structure determination of a novel toxic secondary metabolite from a symbiotic species of the marine sponge *Halichondria okadai*

○菊池 颯[1]、岡田 華弥[1]、長 由扶子[1]、吉田 慎一朗[2]、權 垠相[2]、山下 まり[1]、此木 敬一[1]([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○Sou KIKUCHI[1], Kayo OKADA[1], Yuko CHO[1], Shinichiro YOSHIDA[2], Eunsang KWON[2], Mari YAMASHITA[1], Keiichi KONOKI[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Tohoku Univ. Sci.)

【背景・目的】

クロイソカイメン（*Halichondria okadai*）は関東以南の潮間帯に生息する黒色スポンジ状の多細胞生物であり、微生物を濾過摂取するフィルターフィーダーとして知られている。クロイソカイメンからはこれまでに多くの有毒二次代謝産物が単離・同定されており、その多くが難培養性の共生微生物由来であると考えられている。クロイソカイメンから単離された有毒化合物の代表的な例としては、下痢性貝毒の原因物質として知られるオカダ酸（Okadaic acid, OA）[1)] が挙げられる。近年では、メタゲノムライブラリーを用いた化合物のスクリーニング [2)] により、ハリクロム A などが単離・同定されているが、これら化合物の生合成遺伝子は同定されていない。当研究室では、多様な培養条件の検討により単離した 48 種の共生菌培養抽出物ライブラリーを細胞毒性試験・溶血性試験・ブラインシュリンプ致死活性試験によりスクリーニングし、新規有毒二次代謝産物の探索を行ってきた。その結果、*Lysinibacillus* 属の 1 種において新規化合物 Mb44 が単離された。本発表では、ESI-MS および各種 NMR 解析を用いた Mb44 の構造決定について報告する。

【実験手法・結果・考察】

Mb44 は、高分解能 ESI-MS および各種 NMR（600 MHz）の結果から、2,5-bis(3-indolylmethyl)-pyrazine 様のインドールアルカロイドであることが示唆されたが、Mb44 の ^{1}H NMR スペクトルに再現性は見られず、また一部のピークは広幅化しており、十分な構造情報が得られなかった。精製条件を最適化し、測定溶媒を CD_3OD から DMSO-d_6 に変更した結果、交換性プロトンに由来する HMBC 相関が得られ、完全構造決定に至った。

【参考文献】

1) Tachibana *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469.
2) Abe *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 633.
3) Mohamed *et al*., *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1660.

Marine sponge *Halichondria okadai*, Symbiotic bacteria, Natural product

講演番号：3A18a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A18 会場

Hfq が関わる RNA 代謝を標的とした新規薬剤の探索

A new screening system for compounds targeting Hfq-mediated RNA metabolism

○高田 綾子[1]、和地 正明[2] ([1] 東工大・技術部、[2] 東工大・生命理工学院)
○Ayako TAKADA[1], Masaaki WACHI[2] ([1]Tokyo Tech., [2]Dept. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

細菌感染症の化学療法において、多剤耐性菌の出現は重大な問題となっている。この問題に対抗する有望な戦略の一つは、新規標的を有する薬剤の開発であろう。近年細菌でも転写後の mRNA レベルで分解、プロセシングによる制御を受けている遺伝子の報告が増加しており、遺伝子発現において RNA 代謝が重要であることが示唆されている。我々はこれまでに RNA シャペロンである Hfq タンパク質が細胞分裂遺伝子 *ftsZ* の発現（1）や、病原性に重要な酸耐性機構 Gad システムの発現に関与していることを見出している（2)。そこで、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築し、細菌の細胞分裂や病原性を抑制する新規薬剤の発見を目的として、探索を行ってきた。

Hfq タンパク質の過剰発現は細胞分裂タンパク質 FtsZ の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害する。この分裂阻害を Rifampicin と Streptovaricin C が解除し、コロニー形成を回復することを見出した。Rifampicin 以外のアンサマイシン系抗生物質も Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除したが、非アンサマイシン系 RNA 合成阻害剤は細胞分裂阻害を解除できなかった。アンサマイシン系抗生物質は RNA ポリメラーゼに直接作用して、RNA 合成の開始反応を阻害する。そこで、RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードし Rifampicin に耐性を示す *rpoB* 変異の遺伝的背景において、Hfq 過剰発現株を構築した。その結果、構築した Rifampicin 耐性 *rpoB* 変異株においても、Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害が引き起こされたが、Rifampicin では細胞分裂阻害を解除できなかった。

これらの結果から、アンサマイシン系抗生物質は RNA ポリメラーゼを介して Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除することが示唆された。本 Rifampicin 耐性 *rpoB* 変異株をスクリーニングに利用することにより、アンサマイシン系抗生物質が排除され、新規抗生物質が得られる可能性が高くなると考えられる。

参考文献

(1) Takada A, Nagai K, Wachi M. (2005) A decreased level of FtsZ is responsible for inviability of RNase E-deficient cells. Genes Cells. **10**, 733-741.
(2) Takada A, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M. (2007) RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem. **71**, 158-164.

RNA metabolism, antibiotics, Hfq

発表責任者：和地 正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3A18p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A18 会場

New Isocoumarins, Naphthoquinones, and Cleistanthane Diterpene from *Nectria pseudotrichia* 120-1NP

○Nanang Rudianto ARIEFTA[1,2], Takako ABOSHI[2], Tetsuya MURAYAMA[2], Takuya KOSEKI[2], Naoaki KURISAWA[3], Ken-ichi KIMURA[1,3], Yoshihito SHIONO[1,2] ([1]UGAS, Iwate University, [2]Faculty of Agriculture, Yamagata University, [3]Graduate School of Arts and Sciences, Iwate University)

[Background]

Endophytes are microorganism that are found in plant tissues and maintaining a balance symbiotic association with their hosts.[1] Endophytes are one of rich sources of diverse and pharmacologically active metabolites.[2] In our continuing investigation of endophytic fungi derived from Indonesian plants, strain 120-1NP was found to produce cytotoxic compounds.[3] In this study, we reported further investigation of metabolites produced by *Nectria pseudotrichia* 120-1NP.

[Method and Results]

The fungus strain 120-1NP was fermented in sterilized brown rice at 25 °C for four weeks, the resulting molded media was then extracted with MeOH and dried under vacuum. The MeOH extract was then partitioned between H_2O and EtOAc. The EtOAc layer was dried under vacuum and subsequently subjected to chromatography separation. From those purification processes led to the isolation of the following new compounds: three isocoumarins (**1**-**3**), two naphthoquinones (**4** and **5**), and a cleistanthane-type diterpene (**8**), together with two known naphthoquinone derivatives herbarin (**6**) and *O*-methylherbarin (**7**). Their structure was determined on the basis of 1D/2D-NMR spectroscopy and HRESIMS in combination with chemical means. Compounds **4**-**7** exhibited cytotoxic activity against HL60 cells with IC_{50} values (μM) of 11.9, 1.33, 1.93, and 11.6, respectively.

1) Kusari et al., *Chem Biol.* 165 (2012) 437-449
2) Cragg and Newman, *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 3670-3695
3) Ariefta et al., *Tetrahedron Lett.* 58 (2017) 4082-4086

endophyte, Nectria pseudotrichia, metabolites

発表責任者：Yoshihito Shiono（yshiono@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3A18p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A18 会場

Structural analysis of an antifungal substance from the endophyte Epichloë festucae

○Enkhee Purev, Jennifer Niones, Hitomi Isobe, Rika Miura, Takushi Hashikawa, Tatsuhiko Kondo, Daigo Takemoto, Kazuhito Kawakita, Makoto Ojika (Nagoya University)

[Objective] The *Epichloë* endophytes are a group of the Clavicipitaceae family that resides internal tissues of the tall fescue and ryegrass and enhance their resistance against plant pathogens and harmful insects. Recently, we have revealed that a genetically engineered strain of the endophyte *Epichloë festucae* (strain E437, *vibA* gene over-expressed) secreted a potent antifungal substance against the plant pathogen *Dreschlera erythrospila* (Hantenbyo-kin). The aim of this study is to isolate the antifungal compound and to analyze its chemical structure and biosynthetic mechanism.

[Methods] The endophyte *Epichloë festucae* strain E437 was cultured in PDB medium for 10 days. For antifungal activity, conidia of *D. erythrospila* were incubated with a sample and the inhibition of hyphal germination was observed under a microscope. The culture filtrate was chromatographed on a weak acidic ion exchange resin. The adsorbed fraction, which showed an inhibitory activity, was separated by HPLC (ODS and then HILIC column) to obtain an active pure compound. The chemical structure of the active compound was analyzed mainly by 2D-NMR and MALDI-TOF-MS. The absolute configuration of the compound was determined by advanced Marfey's method.

[Results] The active compound was estimated to be ε-poly-L-lysine (Fig.) based on NMR and advanced Merfey's analysis and the comparison with standard ε-poly-L-lysine. However, the MALDI-TOF-MS was somewhat different from that of standard sample; the former showed very broad peaks around *m/z* 4200 and the latter showed much sharper peaks. Both the purified active compound and standard ε-poly-L-lysine showed a similar inhibitory activity against the conidial germination of *D. erythrospila* at 50 μg/mL. We are now trying to clarify the exact molecular weight using SDS-PAGE, GPC methods, and elemental analysis to obtain the full structure. Since we found an ε-poly-L-lysine synthase (*pls*)-like gene in the *E. festucae* genome, the *pls* gene was transferred in the wild-type *E. festucae* to obtain a genetically modified strain (FI1 strain), which was found to produce a similar compound. We are now comparing spectral data of ε-polylysine-like compounds obtained from E437 and FI1 strains.

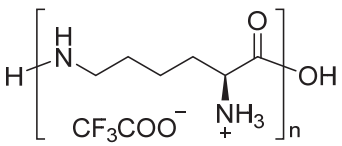


Fig. Estimated structure of antifungal substance

[**Acknowledgment**] We thank JNC Co. for providing us with standard poly ε -lysine.

endophyte, antifungal, biosynthesis

発表責任者：Enkhee Purev（enkheepurev@gmail.com）

講演番号：3A18p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A18 会場

Sphingobium yanoikuyae EC-S001 株が産生する *Burkholderia plantarii* トロポロン生合成亢進因子の探索研究
Separation of bacteria that are highly productive of *Burkholderia plantarii* and search for active substances
○能崎 薫、橋床 泰之（北海道大学院農）
○Kaoru NOZAKI, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】 *Burkholderia plantarii* は，イネ苗立枯細菌病を引き起こす病原細菌で，イネ苗に坪枯れを引き起こす難防除病原菌として恐れられている。*B. plantarii* が産生するファイトトキシンは 7 員環性芳香族化合物 tropolone で，これが示す強い鉄キレート能によって周辺環境が強い鉄欠乏に陥ることが毒性の主原因とされている。我々の研究室では，1 mM 二価鉄硫酸塩添加 Winogradsky's 無機塩培地を 1%ジェランガムで固めたゲルに *B. plantarii* 生菌を混ぜ込んだアッセイ用プレートを調製し，tropolone 合成を促進あるいは抑制する微生物株や化学因子の探索を簡単に行うことができるアッセイ系を開発している [1]。これまで，イネ苗立枯細菌病の病徴発現抑制資材の探索を主たる目的としてポット試験やゲルベッドでのイネ感染苗育成試験を行ってきたが，中には目的とする抑制ではなく，逆に病徴を激しいものへと亢進させるような菌株を希に見出していた。そこで本研究では，*B. plantarii* の tropolone 産生を促進する菌株のスクリーニングと，そのような菌株が産生・放出すると考えられる tropolone 生合成亢進因子の探索を研究目的とした。
［**方法・結果**］ これまでにポット試験でイネ苗立枯細菌病を劇症感染様に変化させた細菌株を 2 種類見出していたため，そのうちの 1 株，ホウレンソウ芽生えから分離した *Sphingobium yanoikuyae* EC-S001 株について，精査した。その結果，*B. plantarii* 生菌混ぜ込みプレートアッセイで強力なトロポロン産生亢進が認められたため，その培養液上清に含まれる二次代謝産物に *B. plantarii* のトロポロン産生亢進活性が認められるか否かをペーパーディスクアッセイによって確認した。その結果，培養液上清固相抽出物の酢酸エチル可溶部に活性を認めた。培養 3 日目で，培養液 2 mL 相当のペーパーディスクの周辺はトロポロン鉄錯体の黒色粒状結晶が多数析出し，0.02 mL 相当ではペーパーディスク周辺に茶色に変色するゾーンが出現した。対照区ではそのような結晶の析出や変色ゾーンは認められなかった。茶色のゾーンはさらに 48 時間培養で黒色粒状結晶体の析出に変化した。このアッセイ系を用いて，活性物質を追跡した結果，この化合物がジケトピペラジンの一種であることを突き止めた。現在，その候補物質の合成に取りかかっており，合成品で活性を検証する予定である。

1) M. Wang, Y. Hashidoko *et al.* (2016) Indole-3-acetic acid produced by *Burkholderia heleia* inhibits tropolone biosynthesis in *Burkholderia plantarii.* **Scientific Reports, 6, 22596 (2016)**.

Burkholderia plantarii, quorum sensing, tropolone

講演番号：3A18p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A18 会場

トリプトファン培地添加により生産誘導される放線菌化合物の同定
Tryptophan-feeding dependent secondary metabolites in actinomycetes
○廣田 万由子[1]、木谷 茂[1]、上田 祥平[1]、池田 治生[2]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]北里大・北里生命科学研究所)
○Mayuko HIROTA[1], Shigeru KITANI[1], Shohei UEDA[1], Haruo IKEDA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

【背景】
インドールアルカロイド化合物は、トリプトファンを出発基質とする化合物群であり、その多くが有用な生理活性を示す。我々は、新規インドールアルカロイド化合物キタセタリンの生合成遺伝子を、放線菌異種発現系の活用により同定した。この研究過程にて、L-トリプトファンをキタセタリン異種生産株に添加したところ、キタセタリンとその類縁体の生産が顕著に増加する現象を見出した。そこで、トリプトファンを放線菌培地に過剰添加すれば、低生産性により見過ごされてきたインドールアルカロイド化合物の生産量が増加し、新規有用物質の発見に繋がるのではないかと考えた。
本研究では、各種放線菌の培地に L-トリプトファンを過剰添加し、その代謝物プロファイルの解析に基づき、新規インドールアルカロイド化合物を同定することを目的とした。

【方法・結果】
海洋放線菌および植物内生放線菌各 40 菌株を、L-トリプトファンを過剰添加した液体培地にて培養し、非添加時の代謝物プロファイルと比較した。その結果、トリプトファン添加により生産誘導される化合物群（**1**-**5**）を検出した。化合物 **1** は、多くの *Streptomyces* 属放線菌にて観測されたため、ゲノム情報が利用可能なエバーメクチン生産菌 *S. avermitilis* に対して同様の実験を行ったところ、同様の生産誘導が観察された。*S. avermitilis* 培養液 300 mL を *n*-ブタノール分配し、その水層をシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーの順により精製、化合物 **1** 20.8 mg を得た。HRTOFMS および各種二次元 NMR スペクトルに基づく構造解析により、化合物 **1** は新規天然物であることが判明した。
一方、化合物 **2**-**5** の化学構造を解析した結果、これらはいずれもインドール環を有する既知化合物であり、化合物 **5** はインドール-3-酢酸であることが明らかとなった。インドール-3-酢酸は植物ホルモンの一種であり、多くの植物関連微生物が生産することが知られている。しかし、化合物 **5** は、海綿共生 *Kocuria* 属放線菌に由来しており、その生物学的意義が注目される。
以上より、トリプトファンを培地に過剰添加する手法は、インドールアルカロイド化合物の同定に繋がり、新規天然物の発見に結びつくことが明らかとなった。

actinomycetes, indole-3-acetic acid, tryptophan

講演番号：3A18p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A18 会場

Discovery of a new antibiotic-siderophore hybrid compound from combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*.

○Abrory Agus Cahya Pramana[1], Sungjin Kawai[2], Manami Kato[1], Shumpei Asamizu[1], Yoshinori Sugai[1], Hiroaki Suzuki[2], Yoshichika Arakawa[3], Hiroyasu Onaka[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Toyota Boshoku, [3]Nagoya Univ.)

[Objective] Combined-culture, a co-culture method using mycolic acid-containing bacteria, e.g. *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 as an inducer bacteria for specialized metabolite production by actinomycetes, had been shown to dramatically alter the secondary metabolite production profile by actinomycetes, and led the isolation of 7 classes, 21 new compounds until now. More recently, there have been increased problems of infectious disease caused by antimicrobial resistant bacteria, and to cope with these problems, a new strategy to discover novel antibiotics is required. Here, we used the combined-culture to test whether it can be applicable for an efficient discovery for the induced antibiosis, as response for the environmental fitness of actinomycetes within microbial competition.

[Methods] We isolated 66 actinomycete strains from soil samples collected at The University of Tokyo Hokkaido Forest in Furano. The 66 strains were cultured in either mono- or combined-culture with *T. pulmonis* and the *n*-BuOH extracts were tested for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* (Bs) using paper disk assay. We found 15 strains showed induced antibiosis in combined-culture. We selected *Streptomyces* sp. HOK021 for further analyses, as the strain produced bioactive compounds specifically in combined-culture. Combination of both bioactivity and LC/MS-guided fractionation led to the isolation of new compounds. Whole combined-culture broth was extracted by ethyl acetate, and subsequent ODS column chromatography and semi-preparative HPLC led to the isolation of the four induced compounds.

[Results and Discussion] Using NMR and HRMS, the HOK021 was found to inductively produce an antibiotic platensimycin, siderophore enterobactin, and dehydrated enterobactin linear dimer, and unknown peak possessing *m/z* 904 $[M+H]^+$. The compund *m/z* 904 $[M+H]^+$ showed typical MS/MS fragmentation pattern to that of platensimycin, and indeed the congener contained platensimycin moiety, and more interestingly it was connected by enterobactin-like moiety through unique thioester bond. We will report the results of structural analysis, bioactivity, and siderophore activity of the newly identified platensimycin-enterobactin hybrid compound.

antibiotic, co-culture, actinomycetes

発表責任者：Hiroyasu Onaka（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A18p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A18 会場

Fast and Effective Dereplication of Free Fatty Acids from Microbial Extracts in *Plasmodium falciparum* Malate: Quinone-Oxidoreductase Inhibitor Screening: The Effect of Alpha-Cyclodextrin Complexation

○ Amila PRAMISANDI[1,2], Kazuyuki DOBASHI[3], Mihoko MORI[1,3], Daniel Ken INAOKA[4], Tomoyoshi NOZAKI[5], Satoshi OMURA[3], Kazuro SHIOMI[1,3] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences. Kitasato University, Japan, [2]Laboratory for Biotechnology, BPPT, Indonesia, [3]Kitasato Institute for Life Sciences, Japan, [4]School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Japan, [5]Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Japan)

[Introduction] *Plasmodium falciparum* malate:quinone-oxidoreductase (*Pf*MQO) is an attractive target for malaria chemotherapy, because the enzyme is essential in erythrocytic stages of the parasite. Screening of *Pf*MQO inhibitors from microbial extracts was performed and free fatty acids (FFAs) were frequently isolated as moderately active substances. As our objective is to discover unubiquitous substances for drug development, a fast and effective dereplication of FFAs is highly necessary in *Pf*MQO inhibitors screening system.

[Method] Alpha-cyclodextrin (αCD) has a specific cavity to form an inclusion complex with FFAs. Optimization of solvent and αCD concentration in FFAs complexation was conducted by using commercially available saturated and poly-unsaturated FFAs and known *Pf*MQO inhibitors. Precipitation rate of the FFAs–αCD complex was determined by measuring *Pf*MQO inhibitory activity and quantitative analysis by HPLC. The FFAs elimination method was applied on microbial extracts screening for *Pf*MQO inhibitors. The microbial extracts that showed remaining inhibitory activity against *Pf*MQO after the αCD treatment were selected as hits of the screening. Metabolite production of hit strains were performed to isolate and purify the bioactive substances.

[Results and discussion] Optimum complexation of αCD and FFAs was obtained by adding 15% of aqueous αCD into linoleic acid solution in 1:1 volume ratio. Methanol was preferable than ethanol for the linoleic acid solvent, due to higher precipitation rate of the inclusion complexation. One hour incubation with gently shaking facilitate an efficient inclusion complexation. Screening of *Pf*MQO inhibitors from 2,148 microbial extracts obtained 116 hits of extract at first (5.4% hit rate). After treatment with αCD complexation, the number of hits significantly decreased to 5 hits (0.23% hit rate). It showed αCD treatment may facilitate dereplication of FFAs in *Pf*MQO inhibitors screening system. Addition of αCD did not affect the inhibitory activity of the positive controls (ferulenol and α-mangostin) against *Pf*MQO. This procedure was promising to screen *Pf*MQO inhibitors from microbial extracts library, to facilitate the discovery of unique and potent substances other than FFAs.

alpha-cyclodextrin, *Plasmodium falciparum*, malate: quinone-oxidoreductase

発表責任者：Kazuro SHIOMI（shiomi@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3A18p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A18 会場

青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第 5 報)

Search for New Chemoattractants of *Ralstonia solanacearum* from Tomato Root Exudates (Fifth report)

○長谷川 琢也[1]、岡部 淳[2]、加藤 雄亮[2]、川出 洋[1,2]、夏目 雅裕[1,2]([1]東農工大・連農、[2]東農工大・院農)
○ Takuya HASEGAWA[1], Atsushi OKABE[2], Yusuke KATO[2], Hiroshi KAWAIDE[1,2], Masahiro NATSUME[1,2] ([1]TUAT United Graduate School of Agri. Sci., [2]TUAT Graduate School of Agri.)

【目的】植物病原細菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は植物の根滲出物に対する走化性誘引応答を利用して宿主植物に接近することで、宿主の認識や感染の促進を行うことが報告されている。これまでにトマトの根滲出物に含まれる数種のアミノ酸・有機酸が青枯病菌の走化性誘引物質として働くことが見出されているが、これらの物質は多くの植物が根滲出物として土壌中に放出していること、他種の細菌も走化性誘引応答を示すことから、宿主の選択性をこれらの物質で説明することはできない。我々はアミノ酸や有機酸のような普遍的な物質の他に、宿主植物に特異的な走化性誘引物質も青枯病菌の感染に重要な役割を果たしていると考えた。これまでの研究で我々は、トマト根滲出物の活性炭カラム吸着画分に未知の走化性誘引活性物質が存在することを見出した。今回、この未知の走化性誘引物質を単離・同定したので報告する。
【方法】トマトを 10 日間水耕栽培することで根浸出液サンプルを回収した。根滲出液に含まれる走化性誘引物質は、Sep-Pak C 18・活性炭・DIOL シリカゲル・NH_2 シリカゲル等の担体を用いて精製し、各画分の活性は培地上にスポットした青枯病菌がペーパーディスクに染みこませたサンプルへ移動する距離を指標とする軟寒天培地法で評価した。
【結果および考察】
上記の担体を用いたカラムクロマトグラフィーで段階的に精製し、走化性誘引活性を追跡した結果、HPLC において単一のピークを示す画分が得られたことより誘引活物質の単離に成功したことが示された。また各種精製方法を試行する過程で本走化性誘引物質が 1)中程度の極性の化合物であること 2)中性の化合物であること 3)糖を構成成分として含む化合物であること が明らかになった。 この単離画分を MS や NMR による構造解析、旋光度分析に供したところ本走化性誘引物質は ethyl β-D glucopyranoside であることが明らかになった。
本化合物は青枯病菌の走化性誘引物質としては初めての報告であり、今後は他菌株・他菌種における走化性誘引応答や構造活性相関について調査していく予定である。

Chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, Root exudates

発表責任者：長谷川琢也（s163012t@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：3A18p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A18 会場

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化物質

TRPV1 activated substance from slug caterpillar (Palasa lepida lepida) venoms

○松井 翼、平川 祥成、今井 邦雄、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○Tsubasa Matsui, Yoshinari Hirakawa, Kunio Imai, Hirotaka Katsuzaki (Mie Univ.)

【背景・目的】

ヒロヘリアオイラガ（*Palasa lepida lepida*）はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫には多数の棘が存在する。棘が皮膚に触れると非常に激しい痛みが引き起こされる。この原因は棘の先端部から出される分泌液によるものだと考えられている。痛み研究においては、痛みと密な関連があると示唆されている transient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）が着目されている。TRPV1 は活性化すると Ca^{2+} を細胞内に流入させる。当研究室の以前の研究で TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いた細胞内カルシウムイメージングにより、ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液中に含まれる TRPV1 活性化物質が確認された。また、ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液から活性に重要とされる、3 つのジスルフィド結合を持ったシスチンノットモチーフ構造のペプチドが発見されている。本研究では RP-HPLC によって TRPV1 活性化成分を単離し、その単離ペプチドの配列解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液をマイクロチューブに回収し、RP-HPLC で分取を行った。

Fluo8-AM を導入した TRPV1 発現 HEK293 細胞に分取画分を添加し、カルシウムイメージングを行った。蛍光上昇が見られた画分 80 を MALDI-TOF/MS で質量分析した。その結果、以前 TRPV1 活性化が確認された値である *m/z* = 3333.9 が検出された。そのため、*m/z* = 3333.9（以下、Pll-3）の配列解析を行うことにした。

Pll-3 を DTT とヨード酢酸を用いて還元及びカルボキシメチル(CM)化した。反応後、RP-HPLC で分取した。MALDI-TOF/MS で分析したところ、*m/z* = 3687.7 が検出された。CM 化前後の質量差が CM 基 6 つ分であったため、Pll-3 はジスルフィド結合を 3 つ持つと推測した。

CM 化 Pll-3 をペプチドシークエンサーで配列解析した。その結果、複数のアミノ酸が同時検出されたが 29 残基の配列を推測した。

CM 化 Pll-3 を MALDI-TOF/MS で MS/MS 測定した。生成したイオンピークの差からアミノ酸を順番に読み解くことで配列解析を行った。その結果、24 残基の配列が確認できた。

CM 化 Pll-3 をトリプシンで酵素消化した。反応後、RP-HPLC で分取した。得られた画分を MALDI-TOF/MS で質量分析した結果、*m/z* = 2649.499 の値が検出された。この値を MS/MS 測定し、配列解析した結果、Pll-3 の断片であることを確認した。

TRPV1, venom, slug caterpillar

講演番号：3A18p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A18 会場

北アフリカ生息種サソリ(*Buthacus leptochelys*)の毒液に含まれる新規殺虫性ペプチドの探索
Search for new insecticidal peptide from the venom of the North African scorpion, *Buthacus leptochelys*.

○義本 裕介[1]、Mohammed Abdel-Wahab[2]、Moustafa Sarhan[2]、宮下 正弘[1]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京都大学大学院農学研究科、[2]Al Azhar Univ.)
○Yusuke YOSHIMOTO[1], Mohammed Abdel-Wahab[2], Moustafa Sarhan[2], Masahiro Miyashita[1], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Al Azhar Univ.)

【目的】サソリは獲物の捕食や天敵からの防衛のために毒を用いる。そのため、サソリ毒液には殺虫、溶血、抗菌など様々な生理活性を示す成分が含まれており、そのほとんどがペプチドである。また、これらのペプチドの中には標的分子に対する高い特異性を持つものがあることから、医薬・農薬への応用が期待されている。しかし、2000 種を超えるサソリの毒液に含まれる成分は全種合わせると 20 万種以上にも及ぶと推定されているものの、現在までに同定されたサソリ毒由来の生理活性ペプチドは全体の 1 %にも満たない。本研究では新規生理活性ペプチドの探索を目的として、これまでに研究例のない北アフリカ生息種サソリ *Buthacus leptochelys* の毒液に含まれる殺虫性ペプチドの単離・構造決定を行った。

【方法】エジプト西部にて採集した *B. leptochelys* から毒液を採取し、実験に用いた。毒液成分の精製は逆相 HPLC（C4 および C18 カラム）を用いて精製した。また、殺虫活性の評価はヨーロッパイエコオロギ（*Acheta domestica*）に対する致死活性を指標とし、50 ± 5 mg の個体の腹部へ注射してから 2 日後に活性を判定した。精製した殺虫性ペプチドの一次構造は、エドマン分解法ならびに質量分析計を用いた *de novo* シーケンシング法により決定した。

【結果および考察】*B. leptochelys* の粗毒液を水に溶解して殺虫試験に供したところ、LD_{50}=30 μg/g 体重の活性を示した。このことから毒液中に殺虫成分が含まれていることが確認できた。殺虫成分を特定するため C4 カラムを用いて主要成分ごとに分画し、それぞれ殺虫試験に供したところ、3 つの画分に顕著な活性が観察された。最も顕著な活性を示した画分について、C18 カラムによる精製と殺虫活性評価を繰り返し行うことにより、殺虫性ペプチド Bl-1 を単離することができた。

続いて Bl-1 の構造決定を行った。まず、Bl-1 をエドマン分解法に供し N 末端 20 残基の配列を決定した。さらに酵素消化して得られたペプチド断片を、エドマン分解法および *de novo* シーケシング法に供し、その他の部分配列を決定した。これらの結果を総合することで、Bl-1 は 67 残基のアミノ酸よりなるペプチドであると結論付けた。

最後に Bl-1 の配列をデータベース検索したところ、Bl-1 は既知のサソリ毒由来殺虫性ペプチドと高い類似性を示した。

natural products chemistry, peptide, Mass-spectrometry

講演番号：3A18p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A18 会場

シキミグンバイ若虫分泌物に含まれる抗菌活性物質の探索

Screening of antibacterial compounds from the exocrine secretions in the nymphs of Stephanitis svensoni

○高原 千尋、清水 伸泰（京都学園大院バイオ環境）
○Chihiro TAKAHARA, Nobuhiro SHIMIZU (Kyoto Gakuen Univ.)

放線菌や真菌からは実に多くの生理活性物質が見つかっており、その中には医薬品や農薬として実用化しているものも少なくない。医薬品のシーズ探索では古くから薬用植物が対象となってきた。全生物の半数以上を占めると言われる昆虫では、生物間相互作用と関連付けられてさまざまな二次代謝物が同定されているが、それは害虫や社会性昆虫が主な対象となっている。当研究室では昆虫を含む節足動物全般を未利用資源と捉え、有用な生理活性物質の探索研究を進めている。

そのような背景のもと、シキミ *Illicium anisatum.*の吸汁性害虫であるシキミグンバイ *Stephanitis svensoni*（カメムシ目グンバイムシ科）の若虫分泌物をヘキサンで抽出し、GC-MS 分析を行なった。脂肪族化合物として decanal、dodecanal、2-undecanone、3-oxododecanal（houttuynin）（**1**）、アセトフェノン類縁体として 2,6-dihydroxyacetophenone （**2**）、1-(2,6-dihydoroxyphenyl)dodecan-1-one （**3**）、5-hydroxy-2-alkylchromanone 類、炭化水素として nonaicosane を検出した。すべての成分について市販の標品あるいは合成物により構造を決定した。これらの中で化合物 **1** はドクダミから単離されており、抗菌性・抗ウイルス性・抗炎症作用が報告されている [1)]。また、decanal と dodecanal は抗菌活性が検討されたキク科とセリ科の精油成分中に見つかっている [2, 3)]。

本研究ではまず、グンバイムシ科に特異的な化合物 **2** と **3** の抗菌活性試験に取り掛かった。試験は化合物 **2** と **3** を含ませたペーパーディスクによる寒天培地上での阻止円形成を指標とし、*S.aureus* と *E.coli* の 2 種類の細菌を対象として行なった。その結果、化合物 **2** は *S.aureus* に対して活性を示し、化合物 **3** は *E.coli* と *S.aureus* に対して活性を示した。他の成分についても順次、生物試験を行う予定にしている。現在はグンバイ若虫の食草であるシキミ葉の成分分析を進めており、それらの結果から若虫分泌物との関連性を考察する。

1) L.Jinbing *et al*., *Eur J Med Chem* **44,** 1737-1744, 2009.
2) V. Roussis *et al*, *Planta Med*. **64**, 675-676, 1998.
3) M. Mahboubi and M.M. Feizabadi, *J. Essen. Oil Bearing Plants* **12**, 574-579, 2009**.**

Antibacterial compound, Stephanitis svensoni, Tingidae

講演番号：3A19a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A19 会場

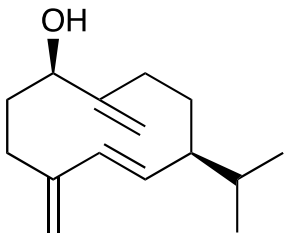
マツリカ（*Jasminum sambac*, 花部）のアロマターゼ阻害活性成分
Effects of constituents from flowers of *Jasminum sambac* against aromatase activity

○井上 尚樹[1]、二宮 清文[1,2]、柴谷 華苗[1]、佐々木 佑人[1]、吉川 雅之[1]、村岡 修[1,2]、森川 敏生[1,2] ([1]近畿大・薬総研、[2]アンチエイジングセ)
○Naoki INOUE[1], Kiyofumi NINOMIYA[1,2], Kanae SHIBATANI[1], Yuuto SASAKI[1], Masayuki YOSHIKAWA[1], Osamu MURAOKA[1,2], Toshio MORIKAWA[1,2] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ., [2]Antiaging Center, Kindai Univ.)

【目的】マツリカ (*Jasminum sambac*) はモクセイ科 (Oleaceae) の熱帯性常緑低木であり，東南アジアからヨーロッパに広く分布している．乾燥した花部はジャスミンティーとして利用されるほか，花部から抽出したジャスミン油が香水などに用いられている．マツリカの花部は中医学においては，下痢，腹痛や結膜炎の治療に，アーユルヴェーダー医学では坑潰瘍，抗がん，坑ハンセン病，皮膚疾患や傷の治療を目的に利用されている．閉経後の女性では，卵巣からのエストロゲン分泌は極端に減少し，副腎などから分泌されたアンドロゲンを基質とし，筋肉や脂肪に発現するアロマターゼによってエストロゲンへと変換される．そのため，アロマターゼ阻害剤が制癌を目的として，エストロゲン受容体陽性の閉経後乳癌の薬物治療に用いられている．我々は，マツリカの花部から調製した MeOH 抽出エキスにアロマターゼ阻害活性 (IC_{50} = 5.7 μg/mL) が認められたことから，その活性寄与成分の探索研究を行った．

【方法・結果】マツリカ花部を MeOH にて還流抽出して，MeOH 抽出エキスを得た．得られた MeOH 抽出エキスを水に懸濁した後，EtOAc にて溶媒分配を行い脂溶性分画である EtOAc 移行部と水層を得た．得られた水層を Diaion HP-20 カラムに付し，水溶出部と MeOH 溶出部を得た．得られた分画について順相および逆相カラムクロマトグラフィー，次いで逆相 HPLC にて繰り返し分離・精製した結果，これまでに 27 種のセスキテルペンやイリドイド配糖体などを単離・同定した．

アロマターゼ阻害活性については，基質として dibenzylfluorescein，補酵素として NADPH を用いてアロマターゼ阻害活性試験を実施した．37°C で 30 分間反応させた後，NaOH 水溶液を加え加温し，生成した蛍光物質の蛍光強度 (Ex 485 nm，Em 535 nm) を測定することで検討した．先ず，MeOH 抽出エキスから調製した分画についてアロマターゼ阻害活性を検討したところ，脂溶性成分が多く含まれる分画である EtOAc 移行部にアロマターゼ阻害活性が集約した．さらに，EtOAc 移行部より得られた化合物についてもアロマターゼ阻害活性を検討したところ，セスキテルペンである 1-hydroxy-4 (15), 5*E*, 10 (14)-germacratriene (**1**, IC_{50} = 12.3 μM) などを活性寄与成分として明らかにした．



1-hydroxy-4(15), 5*E*, 10(14)-germacratriene (**1**)

Jasminum sambac, Aromatase, Breast cancer

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

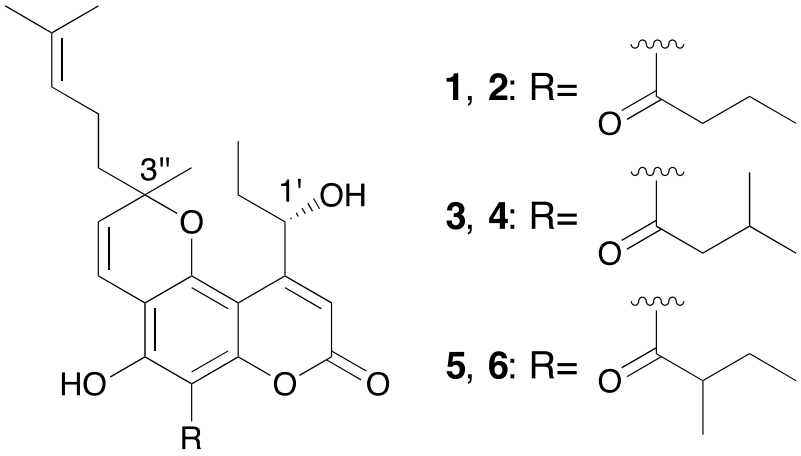
講演番号：3A19a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A19 会場

タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部の新規プレニルクマリン成分とがん細胞増殖抑制活性
Antitumor activity of prenylcoumarins from flowers of *Mammea siamensis*

○杉田 秀美[1]、二宮 清文[1]、村木 謙一[1]、佐伯 竣介[1]、Chaipech Saowanee[1,2]、Pongpiriyadacha Yutana[2]、村岡 修[1]、森川 敏生[1] ([1]近畿大・薬総研、[2]ラジャマンガラ工科大)
○Hidemi SUGITA[1], Kiyofumi NINOMIYA[1], Kenichi MURAKI[1], Shunsuke SAEKI[1], Saowanee CHAIPECH[1,2], Yutana PONGPIRIYADACHA[2], Osamu MURAOKA[1], Toshio MORIKAWA[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ., [2]Rajamangala University of Technology Srivijaya)

【目的】テリハボク科 (Calophyllaceae) 植物 *Mammea siamensis* は，タイをはじめミャンマー，ラオス，ヴェトナムなどの東南アジア地域に分布する常緑樹であり，その花部は民間薬として心臓病などの改善に用いられてきた．我々はこれまでに *M. siamensis* 花部の含有成分として, MeOH 抽出エキスから 4 種の新規プレニルクマリンを単離･構造決定するとともに, 抽出エキスおよびその含有クマリン成分に，リポ多糖によって惹起されるマクロファージの活性化に対する抑制活性[1)] および, 閉経後ホルモン感受性乳がんの治療に利用されているアロマターゼ阻害活性[2,3)] を明らかにしている. 今回, さらに含有成分の探索研究を行うとともに，ヒト舌がん由来細胞株である HSC-4 に対する細胞増殖抑制活性を検討した.

【方法・結果】タイ産 *M. siamensis* 花部を MeOH にて熱時抽出し，得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc および水で溶媒分配し，EtOAc 移行部および水移行部を得た．得られた水移行部を Diaion HP-20 カラムに付し, 水および MeOH にて順次溶出し，水および MeOH 溶出部を得た．さらに，EtOAc 移行部について, 順相, 逆相カラムクロマトグラフィー, 次いで HPLC にて繰り返し分離精製した．これまでに新規クマリン誘導体 mammeasin A–D を含む計 43 種のクマリンを単離・同定した．今回, さらに含有成分を精査した結果，新たに 6 種の新規ゲラニルクマリン (**1**–**6**) を単離・構造決定した．得られた新規化合物のうち, 化合物 **1** および **2** は, ジアステレオ混合物として報告されている既知化合物の kayeassamin I であることが判明した．加えて, 化合物 **3**–**6** の 1' 位の立体化学について, 既知化合物からの誘導により *S* 配置と決定した．また，得られた単離化合物の，HSC-4 細胞における細胞増殖抑制活性についてもあわせて報告する.



1) *Bioorg. Med. Chem*., **20**, 4968-4977 (2012).
2) *Chem. Pharm. Bull*., **64**., 880-885 (2016).
3) *Tetrahedron*, **73**, 4481-4486 (2017).

Mammea siamensis, Aromatase, Prenylcoumarin

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：3A19a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A19 会場

ローズヒップエキスおよび *trans*-tiliroside が肝細胞内脂質代謝におよぼす影響

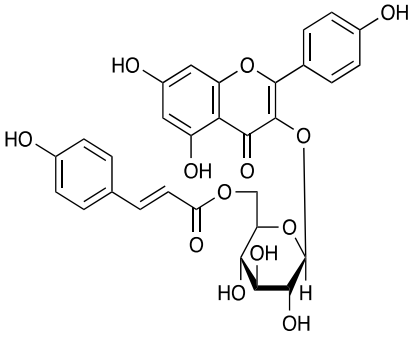
Effects of Rose Hip Extract and *trans*-Tiliroside on Lipid Metabolism in Hepatocyte

○長友 暁史[1,3]、二宮 清文[1,2]、松本 亜衣[1,3]、児玉 高幸[3]、川上 宏智[3]、吉川 雅之[1]、村岡 修[1,2]、森川 敏生[1,2] ([1]近畿大・薬総研、[2]近畿大・アンチエイジングセ、[3]森下仁丹)
○Akifumi NAGATOMO[1,3], Kiyofumi NINOMIYA[1,2], Ai MATSUMOTO[1,3], Takayuki KODAMA[3], Hirosato KAWAKAMI[3], Masayuki YOSHIKAWA[1], Osamu MURAOKA[1,2], Toshio MORIKAWA[1,2] ([1]Kindai Univ. Pharmaceutical Research and Technology Institute, [2]Kindai Univ. Antiaging Centre, [3]Morishita Jintan Co., Ltd.)

【目的】肝臓に中性脂肪 (TG) が過剰に蓄積した脂肪肝は，生活習慣病のリスクファクターのひとつで，肥満症に高頻度で併発していることが知られており，脂肪肝の改善は肥満症やメタボリックシンドロームの予防または改善に寄与すると考えられる．バラ科 (Rosaceae) バラ (*Rosa*) 属植物の果実はローズヒップと称され，伝承薬としてだけでなく，お茶などの嗜好飲料のほか，ジャムやスープなどの食品や化粧品原料として広く利用されている．我々は，チリ産 *Rosa canina* L. の種子から得た 80% 含水アセトンエキスがマウスにおいて強力な体重増加抑制作用を示し，その活性寄与成分がアシル化フラボノール配糖体 *trans*-tiliroside (**1**) であることを見いだしている．本研究では，チリ産ローズヒップの含水エタノールエキス (RHE), **1** およびその関連化合物について，ヒト hepatoblastoma HepG2 細胞を用いて脂肪蓄積抑制作用および脂肪代謝促進作用を検討するとともに，**1** の化学構造と活性の相関についても検討した．

【方法】〔脂肪蓄積抑制作用〕HepG2 細胞を 48 穴マイクロプレートに播種し，翌日に被験物質を添加した 5% oleic acid-albumin (OA) 含有 DMEM に培養液を交換し，さらに 4 日間培養した．被験物質含有培養液は 2 日ごとに交換した．〔脂肪代謝促進作用〕HepG2 細胞を 48 穴マイクロプレートに播種し，高濃度グルコース (4500 mg/L) 含有 DMEM で 6 日間培養した．6 日目に培養液を被験物質を添加した低濃度グルコース (1000 mg/L) 含有 DMEM に交換し，20 時間培養した．培養終了後に超音波処理により細胞を破砕し，得られた細胞破砕液中の TG 濃度および細胞毒性の指標としてタンパク質濃度を定量した．

【結果】OA を添加した DMEM または高濃度グルコース含有 DMEM での培養により，HepG2 細胞内への TG の顕著な蓄積が観察された．いずれの試験においても，RHE および **1** は HepG2 内の TG 含量を濃度依存的に減少させた．**1** の関連化合物のうち，フラボノイドおよびアシル化フラボノール配糖体に活性が認められたことから **1** の活性発現には配糖体に結合したアシル基の存在が必須であることが示唆された．さらに，フラボノール B 環部の水酸基の数やグルコースの 6 位に結合したアシル基のジオメトリーは活性に影響しないこと，*p*-クマル酸部分の水酸基の位置により活性が変化することなどを明らかにした．



trans-tiliroside (**1**)

Rose Hip, HepG2, Lipid metabolism

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：3A19a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A19 会場

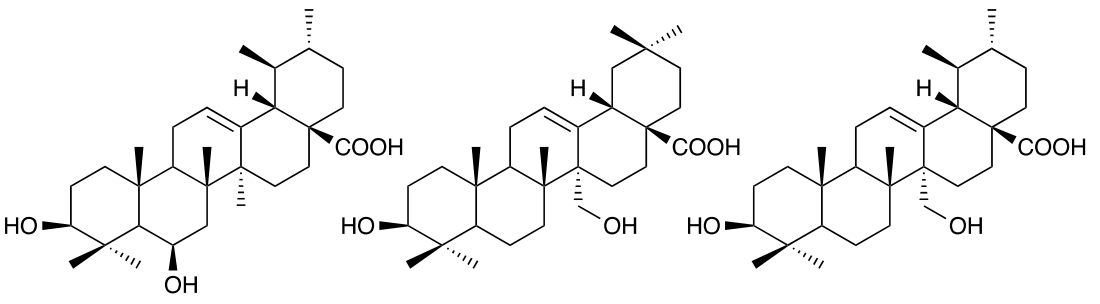
釣藤鉤（*Uncaria rhynchophylla* 鉤部）由来トリテルペン成分の神経様突起伸長作用

Effects of triterpenoids from hooks of *Uncaria rhynchophylla* on neurite outgrowth in PC12 cells

○菅原 碧、二宮 清文、河端 千尋、今野 拓哉、南野 享、森川 敏生（近畿大・薬総研）
○ Aoi SUGAWARA, Kiyofumi NINOMIYA, Chihiro KAWABATA, Takuya KONNO, Tohru MINAMINO, Toshio MORIKAWA (Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ.)

【目的】第十七改正日本薬局方に収載される生薬である釣藤鉤は，日本，中国の暖地に自生するつる性植物で，アカネ科 (Rubiaceae) 植物カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla* Miquel など) のとげである．日本では，高血圧に伴う頭痛，目眩，精神的興奮症状などの緩和を目的に釣藤散や抑肝散などに配剤される．近年臨床に於いて，痴呆症の周辺症状の改善に抑肝散などが利用され，症状の改善が認められていることから，有効成分の解明を目的に PC12 細胞における神経様突起伸長促進作用について検討した．特に，抑肝散の構成生薬のひとつである釣藤鉤の MeOH 抽出エキスに強い活性が観察されたことから，活性成分を明らかにするため，本エキスより得られた成分について検討したので報告する．

【方法・結果】釣藤鉤とげ部 (2.6 kg) を MeOH にて熱時抽出して MeOH 抽出エキス (生薬からの収率 15.7%) を得た．得られた MeOH 抽出液を EtOAc/3% 酒石酸水溶液にて分配して EtOAc 層と水層を得た. 得られた水層に $NaHCO_3$ を加え (pH 9.0), 次いで $CHCl_3$ にて抽出して $CHCl_3$ 層を得た．さらに，この水層を *n*-BuOH にて抽出して BuOH 層を得た．得られたそれぞれの分画を順相および逆相カラムクロマトグラフィー，HPLC により繰り返し分離精製して，計 25 種の化合物を単離・同定した．また，得られた成分については，PC12 細胞を用いて神経様突起の伸長作用について検討した．その結果, 6β-hydroxyursolic acid (**1**) などに神経様突起の伸長促進が観察された．さらに，nerve growth factor (NGF) 共存下での神経様突起伸長作用についても，得られた成分について検討した結果, mylicerol (**2**), 3 β ,27-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**3**) など，NGF 非共存下では神経様突起伸長亢進作用が認められなかった成分にも，神経様突起伸長促進作用が観察された. 加えて，最も良好な活性を示した **1** について，その作用機序を検討したので，併せて報告する．



6β-hydroxyursolic acid (**1**)　myricerol (**2**)　3β,27-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**3**)

Uncaria rhynchophylla, PC12, triterpen

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：3A19a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A19 会場

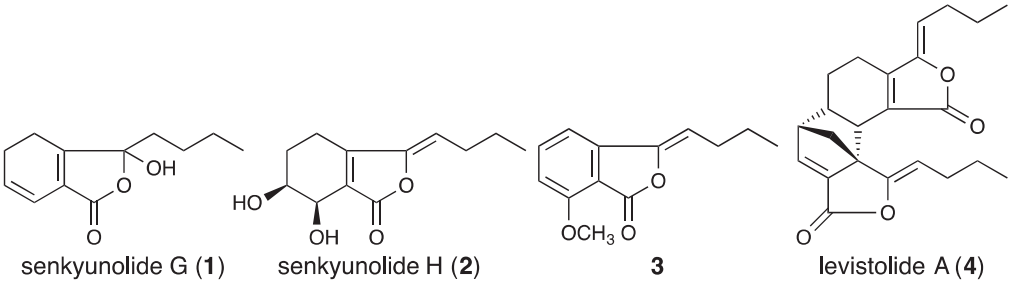
川芎（*Cnidium officinale*, 根茎）の糖代謝改善作用成分

Effects of constituents from rhizomes of *Cnidium officinale* on lipid and glucose metabolism

○宮坂 賢知、二宮 清文、二宮 与、酒井 千恵、塩谷 美幸、森川 敏生（近畿大・薬総研）
○ Kenchi MIYASAKA, Kiyofumi NINOMIYA, Kumi NINOMIYA, Chie SAKAI, Miyuki SHIOTANI, Toshio MORIKAWA (Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ.)

【目的】川芎は，第十七改正日本薬局方に収載される生薬であり，中国原産の多年草であるセリ科 (Umbelliferae) 植物センキュウ (*Cnidium officinale*) の根茎を，通例，湯通したものである．本生薬は，婦人病，冷え性，皮膚疾患の改善や消炎排膿を目的に種々の処方に配剤される．我々は，川芎 MeOH 抽出エキスのマウスへの連続投与が耐糖能を改善し，肝臓中中性脂肪 (TG) 含量を有意に低下させることを見いだしたことから，活性寄与成分の探索研究を実施した．

【方法・結果】川芎の含有成分を精査した結果，13 種のフタリド類および 4 種のフェニルプロパノイド等を含む計 24 種の化合物を単離・同定した．得られた成分について，ヒト hepatoblastoma HepG2 を用いて，細胞内 TG 含量に与える影響を検討した．実験は，HepG2 細胞を高濃度グルコース含有培地により培養することで，細胞内に TG を蓄積させた．その後，培養液を被験物質を含有する培地に交換して，更に 20 時間培養した．培養後，培養液を除去，さらに細胞破砕液を超音波処理により調製し，破砕液中の TG 濃度とタンパク質濃度を定量した．川芎より得られた成分について細胞内 TG 低減活性を検討した結果，senkyunolide G (**1**) および senkyunolide H (**2**) などが有意に TG 含量を低下させることを明らかにした．さらに，作用機序に関する検討から，脂肪合成に関わる酵素である fatty acid synthase (FAS) の発現に与える影響を検討した．その結果, senkyunolide H (**2**) に FAS 発現の低下が観察された．さらに，*in vivo* での評価において，川芎の MeOH 抽出エキスが耐糖能を改善したことから，ラット筋芽細胞である L6 細胞を用いて，MeOH 抽出エキスについて培養液中の糖消費促進活性を検討した．その結果，MeOH 抽出エキスは，L6 細胞において，インスリン様の糖消費促進活性を示すことを見いだした．そこで，MeOH 抽出エキスより調製した分画の活性についても検討した結果，活性は脂溶性成分が多く含まれる EtOAc 可溶分画に集約することが明らかになった．さらに EtOAc 可溶分画から得られた成分についても，同様に糖消費促進活性を検討した結果，フタリドである *Z*-3-butylidene-7-methoxyphthalide (**3**) およびフタリド二量体である levistolide A (**4**) などに有意な糖消費促進活性が認められた．



senkyunolide G (**1**)　senkyunolide H (**2**)　**3**　levistolide A (**4**)

Cnidium officinale, Diabetes, Obesity

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

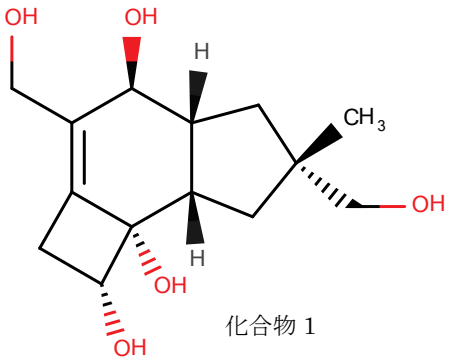
講演番号：3A19a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A19 会場

ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）子実体に含まれるセスキテルペン類について

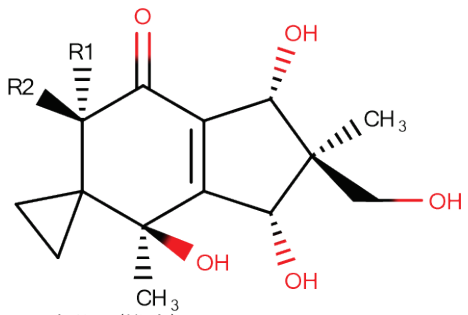
Sesquiterpenes from fruiting body of *Omphalotus guepiniformis*

○青木 聡樹、網干 貴子、塩野 義人、村山 哲也（山形大学）
○Satoki AOKI, Takako ABOSHI, Yoshihito SHIONO, Tetsuya MURAYAMA (Yamagata Univ.)

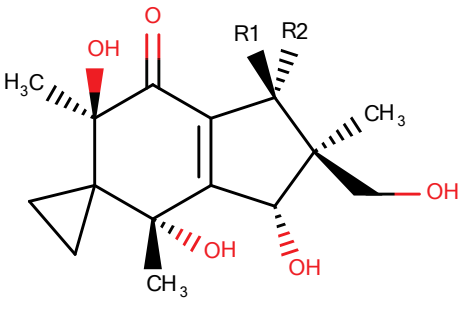
【目的】当研究グループでは、高等植物及び菌類に含まれる生理活性物質について研究を続けてきた。本発表ではツキヨタケより前年度報告した新規 protoilludane 型セスキテルペン化合物に引き続き、新たに 2 種の新規とみられる illudane 型セスキテルペン化合物を単離し構造決定したので報告する。
【方法と結果】山形県朝日村で採集したツキヨタケ子実体 4.6kg をメタノールに浸漬し、ヘキサンと酢酸エチル、ブタノールで分画した。レタス幼植物体を使った植物成長調節活性試験において地下部の成長を抑えたブタノール画分を TLC 上の発色に基づきシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどを用いて分画し、化合物 2 及び化合物 3 を単離した。^{1}H NMR より、両化合物は 0.01~0.80ppm の領域に 4 本の多重線ピークが確認され、シクロプロパン環の存在が示唆された。また ^{13}C NMR 及び DEPT90°、DEPT135°より、3 個のメチル炭素と 3 個のメチレン炭素、2 個のメチン炭素、7 個の四級炭素の計 15 個の炭素を有することが示唆された事から illudane 型セスキテルペンの一種であると推定した。加えて ^{13}C NMR のケミカルシフト値から二重結合とカルボニル基がそれぞれ 1 個存在する事が示唆され、また DMDO-*d*$_6$ を重溶媒に用いた ^{1}H NMR から 5 本の水酸基ピークが確認された。以上の結果から分子式は $C_{15}H_{22}O_6$ であると推定した。HMQC 並びに HMBC を用いて解析したところ、両化合物は共通の平面構造を有しており、加えてツキヨタケに含まれる毒性成分として既に報告されている neoilludin A 及び neoilludin B と同様の平面構造を有している事が示唆された。そこで NOE を用いた立体解析を行ったところ、化合物 2 及び化合物 3 は neoilludin A 及び neoilludin B の立体異性体であることが示唆された。我々の知る限り neoilludin に属する化合物で報告されているのは上記 2 種のみであることから、化合物 2 及び化合物 3 は新規であると考えられる。



化合物 1



化合物 2(推定) R1=CH_3 R2=OH
化合物 3(推定) R1=OH R2=CH_3



neoilludin A R1=OH R2=H
neoilludin B R1=H R2=OH

Omphalotus guepiniformis, sesquiterpene, illudin

発表責任者：青木聡樹（aoki0913@hotmail.co.jp）

講演番号：3A19a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A19 会場

メノマンネングサ(*Sedum japonicum*)に含まれる新規フラボノイド配糖体について

Novel flavonoid glycosides from *Sedum japonicum*

○千葉 恒太、網干 貴子、塩野 義人、村山 哲也（山形大院農）
○Kota CHIBA, Takako ABOSHI, Yoshihito SHIONO, Tetsuya MURAYAMA (Yamagata Univ.)

【目的】当研究グループでは、主に高等植物に含まれる生理活性物質について研究してきた。ベンケイソウ(*Sedum erythrostictum*)やツルマンネングサ(*Sedum sarmentosum*)などのマンネングサ属は薬用植物として利用されている。これまでマンネングサ属からセダムアルカロイドに代表されるアルカロイド、抗炎症活性や抗菌活性などの生理活性を持つフラボノイドなどが発見されている。そこで研究例の少ないメノマンネングサ(*Sedum japonicum*)に注目し、これを新規生理活性物質の探索源とした。そのなかでも高極性画分に着目し、新規フラボノイド配糖体を得たので報告する。

【方法と結果】山形県沿岸の岩場で採集したメノマンネングサ(*Sedum japonicum*)3.58 kg をミキサーで粉砕し、メタノール、酢酸エチルで抽出して粗抽出物を得た。粗抽出物を水で懸濁し、ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールで分画した。レタス幼植物を使った植物成長調節活性試験で地下部の成長を抑えた酢酸エチル画分について、TLC での挙動をもとにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC などを用いて、4 種の新規化合物 1～4 を単離した。

高分解能質量分析より化合物 1、4 の分子式は $C_{32}H_{34}O_{20}$、化合物 2、3 の分子式は $C_{32}H_{34}O_{19}$ と判明した。化合物 1 は NMR スペクトル、加水分解の結果からゴッシペチンにグルコースとトリアセチルアラビノースが結合したフラボノイド配糖体と推定した。化合物 2 は NMR スペクトル、加水分解の結果からヘルバセチンにグルコースとトリアセチルアラビノースが結合したフラボノイド配糖体と推定した。化合物 3、4 は NMR スペクトルからそれぞれ化合物 2、1 のアラビノースがキシロースになった異性体と推定した。

Sedum japonicum, flavonoid glycoside, gossypetin

発表責任者：千葉　恒太（a170025m@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3A19a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A19 会場

リンゴの傷害応答性トリテルペン類縁体の経時変化

Time course study of the triterpenoids in apple fruit induced by injury

○大畑 勇統[1]、森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1]([1]京大農、[2]青森産技セ　りんご研)
○Yuto OHATA[1], Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]AITC)

【目的】
リンゴ果実はモモシンクイガ幼虫の食害を受ける．2015 年度の本大会で，食害部の近傍でトリテルペン 3α,19α-dihydroxy-3-oxo-12 ursen-28-oic acid (3-Oxo-TA)が誘導されること，この誘導は果実の物理的な傷害で起こり，幼虫の食害は必要ないことを報告した[1)]．今回，構造未知のトリテルペンの誘導を新たに認めた．植物は二次代謝産物を生合成して様々なストレスへの防御応答を行うので，傷害により誘導されるトリテルペンがリンゴ果実内で何らかの生理的な役割を担っている可能性が示唆される．そこで，これら 2 種の化合物の誘導量の経時変化を調べた．

【方法・結果】
今回, 傷害により誘導が確認された化合物はトリテルペン類縁体の一種で, 分子量 484 と推定された．傷害を与えたリンゴ幼果のメタノール抽出液から，この化合物を高速液体クロマトグラフイーを用いて精製し，NMR で解析した．この結果，3-Oxo-TA とは異なるタイプのトリテルペンと推察された．次に，果実傷害後の上記 2 種のトリテルペンの動態について経時変化を調べた．健全なリンゴ幼果に傷害を与え，一定時間経過ごとに傷害周辺部を切り出してメタノールで抽出した．これを LC/MS で分析し，2 種のトリテルペンの誘導量を調べた．その結果，今回新たに注目したトリテルペンは傷害を与えてから約 48 時間後から誘導されるのに対し， 3-Oxo-TA は傷害後 24 時間以内に誘導された．これらの結果から，傷害により誘導されるトリテルペン類の誘導パターンは単一ではなく，複数の誘導経路が存在すると示唆された．また，これらトリテルペン類の鱗翅目昆虫に対する生理活性についても検討した．これらの結果から傷害応答性トリテルペンの生態学的役割について報告する．

1）森田ら，2015 年度日本農芸化学会要旨集，2016

apple fruit, insect damage, induction

発表責任者：大畑勇統（oohata.yuuto.87e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A19a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A19 会場

モモシンクイガに対する炭酸カルシウム水和剤の産卵阻害活性

Oviposition inhibitory activity of calcium carbonate wettable powder against the peach fruit moth

○風間 春奈[1]、高梨 琢磨[2]、所 雅彦[2]、石栗 陽一[3]、森 直樹[1]、吉永 直子[1] ([1]京大院農、[2]森林総研、[3]青森産技セ りんご研)
○Haruna KAZAMA[1], Takuma TAKANASHI[2], Masahiko TOKORO[2], Yoichi ISHIGURI[3], Naoki MORI[1], Naoko YOSHINAGA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]FFPRI, [3]AITC)

モモシンクイガ *Carposina sasakii* は，リンゴ栽培におけるもっとも重要な害虫であり，台湾への輸出時には検疫対象にも指定されている．興味深いことに，炭酸カルシウム水和剤ホワイトコート((株)白石カルシウム) を散布した果実で産卵数が有意に減少することが報告された [1)]．昨年度の本大会で，本剤を噴霧した果実の香気成分中に特異的に 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol Diisobutyrate (Txib^{TM}) が検出されたこと，雌成虫触角を用いて GC-EAD 分析すると Txib に電位応答が得られたことを報告した．したがって，本剤が示す産卵抑制効果の要因として，主成分 $CaCO_3$ による物理的抑制と，Txib による化学的忌避の 2 つの可能性が考えられたため，生物試験を行い検証した．また，Txib の類縁体も同定したので，その活性についても合わせて報告する．

Txib，$CaCO_3$ およびホワイトコート処理果において，モモシンクイガ成虫を用いた産卵試験を行った．その結果，いずれの処理果でも産卵数の顕著な減少が見られた．これらの抑制メカニズムを詳細に調べるため，赤色光下で録画記録した雌成虫の行動を解析した結果，Txib 処理果では，雌成虫が果実周辺で化学感覚器による探索行動を念入りに行う一方，果実上での探索はまれで，産卵前行動 (腹曲げ) はほとんど観察されなかった．よって，当該化合物の化学的特性によって産卵対象の果実への接触あるいは産卵が妨げられたと考えた．他方で，$CaCO_3$ 処理果では，雌成虫が果実表面で脚を滑らせることが判明した．$CaCO_3$ 散布により果実表面の物理的構造が変化したためと考えた．この物理的変化はホワイトコート散布時には確認されなかったため，本剤の産卵抑制メカニズムは展着剤の一種 Txib の化学的特性に起因することが明らかになった．

また，ホワイトコート抽出物より Txib のモノエステル類縁体を同定したが，産卵数・行動試験のいずれにおいても Txib のような活性は見られなかった．このことから，本化合物のジエステル構造が産卵抑制活性の発現に重要と考えた．

1) 石栗陽一・吉永直子 (2015) モモシンクイガのリンゴ果実への産卵に及ぼす炭酸カルシウム水和剤の影響．北日本病虫研報 66:144-147.

Carposina sasakii, oviposition inhibitory effect, calcium carbonate wettable powder

発表責任者：吉永直子（yoshinaga.naoko.5v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A19a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A19 会場

ブラジル バイーア州産プロポリス成分の構造解析と in vitro 抗がん活性

Chemical constituents of Brazilian propolis from the state of Bahia and their growth inhibitory activities against cancer cells in vitro

○光井 太一、堀田 翔、田澤 茂実、加藤 健司、市原 賢二（アピ株式会社）
○Taichi MITSUI, Sho HOTTA, Shigemi TAZAWA, Kenji KATO, Kenji ICHIHARA (Api Co. Ltd.)

【背景】

プロポリスは，ミツバチが巣の周辺に生息する植物の新芽や樹液をもとにつくる樹脂様物質である．プロポリスは，古くから健康維持･増強などの目的で食されており，これまでも様々な機能性が報告されている．プロポリスの一大産地であるブラジルでは，植生も多岐にわたることから，採取されるプロポリスの種類も豊富である．我々はノルデステ社の協力により，ブラジル東部に位置するバイーア州産プロポリスを入手した．このプロポリスは，これまで知られているグリーン，ブラウン，レッドなどのプロポリスとは異なる特徴を有しており，ブラジルでは古くから抗がん活性が強いとの報告がある．そこで，今回，このバイーア州産プロポリスのエタノール抽出物に含まれる成分を単離し，構造決定を行い，得られた化合物の *in vitro* におけるがん細胞増殖抑制作用を検討したので報告する．

【単離・構造解析】

バイーア州産プロポリスの原塊を 95% エタノールにて抽出し，各種クロマトグラフィーおよび分取 HPLC により精製を行い，6 種類の化合物 (化合物 **1-6**) を単離した．化合物 **1** は，単結晶 X 線結晶構造解析より，クロモン骨格 2 位にフェニル基がエーテル結合した新規 2-phenoxychromone 型の化合物であることが判明した．なお，我々が知る限り，プロポリスから phenoxychromone 型の化合物が単離されたのは今回が初めての報告となる．その他，5 種類の化合物 (**2-6**) については，NMR を中心とした各種機器分析手法で構造解析を行い，文献値との比較の結果から，それぞれ 3-*O*-methylquercetin (**2**), 3,6,4’-trimethoxychrysin (**3**), 3, 6-dimethoxyapigenin (**4**), 6-methoxykaempferol (**5**), 6-methoxyapigenin (**6**) であると同定した．

【*in vitro* 抗がん活性】

単離・構造決定したこれら 6 種類の化合物について，各種がん細胞 (DLD-1, MCF-7, A549) における増殖抑制効果を評価した．その結果，化合物 **2**, **3** および **4** には，比較的強いがん細胞増殖抑制効果 (IC_{50} < 50 μM) が認められた．これらの化合物には，共通して C 環の 3 位にメトキシ基を有していることが明らかとなり，このメトキシ基ががん細胞増殖抑制に関与する重要な部分構造であることが示唆された．

Brazilian propolis, 2-phenoxychromone, anti-cancer activity

講演番号：3A19a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A19 会場

β複素環アラニン化合物によるエンドウ芽生えの重力屈性メカニズムの解明
Study on the gravitropic mechanism of pea epicotyls by heterocyclic ß-substituted alanines
○繁森 英幸[1]、大宮 由芽[2]、小出 麻友美[2]、長谷川 剛[2]、山田 小須弥[1]、宮本 健助[3]、上田 純一[4]、長谷川 宏司[1] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境、[3]大阪府立大高等教育、[4]大阪府立大院理)
○Hideyuki SHIGEMORI[1], Yume OMIYA[2], Mayumi KOIDE[2], Tsuyoshi HASEGAWA[2], Kosumi YAMADA[1], Kensuke MIYAMOTO[3], Junichi UEDA[4], Kouji HASEGAWA[1] ([1]Facul. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]Facul. Liberal Arts Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】
植物の普遍的な生物現象の一つである『重力屈性』は、植物が重力刺激に応答して茎は上方へ根は下方へと屈曲しながら成長する屈性現象である。そのメカニズムは、光屈性と同様に上側組織と下側組織におけるオーキシンの偏差分布により屈曲が生じるという Cholodny-Went 説によって説明されてきた。一方で、光屈性において前者に対峙する説として光側組織での光屈性制御物質の生成により屈曲するという Bruinsma-Hasegawa 説が提唱されている。当研究グループでは、重力屈性現象メカニズムにおいてもこれに相当する重力屈性制御物質の関与を想定しており、その物質の探索研究を行っている。そこで本研究では、エンドウ（*Pisum sativum* L.）芽生えから重力屈性制御物質を単離し、それらを用いて重力屈性メカニズムを解明することを目的とした。

【方法および結果】
１）重力刺激下でのエンドウ芽生えにおける変動物質の HPLC 分析：エンドウ芽生えを横に傾けることで重力刺激を与えて経時的にサンプリングを行い、逆相 HPLC を用いて分析することによって増減のあるクロマトピークを特定した。
２）化合物の単離・構造決定：大量のエンドウ芽生えを有機溶媒で抽出し、カラムクロマトグラフィーや HPLC 等を用いて順次分離・精製を行い、上記のクロマトピークに相当する化合物を単離した。NMR や MS を用いた機器分析により構造解析を行った結果、本化合物はβ複素環アラニン化合物β-(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine （βIA）であることが明らかとなった。この化合物以外にも関連化合物として willardiine および isowillardiine を同時に単離し、構造同定を行った。
３）得られた化合物の生物活性試験：単離した３種の化合物について、エンドウ芽生えにおける片側投与実験・セクションテスト・ティッシュプリントに供した。その結果、これらの化合物にエンドウ芽生えに対する屈曲活性、オーキシン活性阻害ならびに活性酸素の産生が認められた。
以上のことから、エンドウ芽生えの重力屈性メカニズムは、βIA 等のβ複素環アラニン化合物が上側組織で増量することによって成長抑制が誘導され屈曲が起こると考えられる。当研究グループにおけるこれまでの光屈性メカニズム解明研究とも併せて、重力屈性においても植物ホルモン以外の重力屈性制御物質によって重力屈性現象が制御されていることが明らかになれば、Bruinsma-Hasegawa 説を支持することにもつながり、学術的にも大きな意義がある。

gravitropism, Bruinsma-Hasegawa theory, gravitropism-regulating substance

発表責任者：繁森　英幸（shigemori.hideyuk.fn@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A19a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A19 会場

ヒト血清アルブミンの糖化を抑制するスパイス・ハーブの成分同定

Identification of spice and herb components that inhibit glycation of human serum albumin.

○小堺 瑞己、ピピョー ナイン、盧 翌、片山 幸江、鈴木 道生、永田 宏次（東京大農）
○Mizuki KOZAKAI, Naing Pyae Phyoe, Yi Lu, Yukie Katayama, Michio Suzuki, Koji Nagata (Tokyo Univ.)

【背景と目的】

糖化反応はタンパク質や脂質が糖と結合する非酵素的な反応であり、老化を促進する因子のひとつである。糖化により、生体内のタンパク質の構造・機能が変化して、動脈硬化の進行、糖尿病の三大疾病（神経症、腎症、網膜症）の進行、コラーゲン繊維間の架橋形成による骨強度の低下、皮膚の老化など、生活習慣病や老化の進行が引き起こされる。さらに、糖化により生じる終末糖化産物 AGEs（Advanced Glycation End Products）は細胞表面の受容体（Receptor for AGEs, RAGE）に結合し、サイトカインや成長因子の産生亢進といった細胞応答も誘発し、糖尿病血管合併症をはじめとする種々の疾患が発症、進展する。糖化を受ける代表的な血中タンパク質として、ヒト血清アルブミン（HSA）とヘモグロビン（Hb）が知られる。HSA と Hb の糖化産物はそれぞれ採血前 2～3 週間と 1～2 か月間の平均血糖値を示すマーカーとして用いられる。HSA の糖化は、Hb の糖化と比較して、数倍生じやすく、血中グルコース濃度の変動に速やかにかつ大きく応答する。そこで、我々は HSA の糖化を指標として、糖化反応を抑制する食品成分の同定とその作用機構の解明を目的として、本研究を行った。食品として、21 種類のスパイス・ハーブを用いた。

【方法と結果】

糖化の阻害率は、HSA とグルコースの糖化反応により生じる蛍光性 AGEs の量を蛍光プレートリーダーで測定・算出する方法により評価した。この系に市販の 21 種類のスパイス・ハーブ熱水抽出物を添加し、HSA 糖化阻害率を算出した。

その結果、8 種類のスパイス・ハーブ熱水抽出物で糖化を 80%以上阻害することが示された。現在、この 8 種類の熱水抽出物を、逆相 HPLC で分画し、質量分析および NMR により、各熱水抽出物の活性成分の同定を進めている。

glycation, human serum albumin, spice and herb extracts

講演番号：3A19a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A19 会場

ポプラの根浸出物に含まれるストリゴラクトンの同定および構造解析
Identification and structure determination of strigolactones from Populus root exudate
○下野 叡[1]、松下 明真[1]、米山 香織[2]、岡本 昌憲[3]、野村 崇人[1,3]、米山 弘一[3]、謝 肖男[1,3]([1]宇都宮大院・農、[2]愛媛大・農、[3]宇都宮大・バイオ)
○ Satoshi Shimono[1], Asuma Matsushita[1], Kaori Yoneyama[2], Masanori Okamoto[3], Takahito Nomura[1,3], Koichi Yoneyama[3], Xiaonan Xie[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Fac. of Agri., Ehime Univ., [3]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】
ストリゴラクトンは植物地上部の枝分かれを抑制する植物ホルモンであり、根寄生植物とアーバスキュラー菌根菌の宿主認識シグナルでもある。これまでに様々な植物の根浸出液からストリゴラクトン（Strigolactone = SL）が単離され、構造決定されてきた。本研究では、SL の生合成経路および植物界における分布をより明確にするため、これまで知られていなかった樹木のモデル植物であるポプラが生産する既知 SL の同定および新奇 SL の構造解析を行った。
【方法・結果】
実験にはポプラ(*P. nigra* × *P. trichocarpa*)を用い約２０ｃｍに切った直径１cm のポプラの枝を挿し木にして、根と葉が生え始めるころに、軽石を敷き詰めたコンテナに植え替え、礫耕栽培した。その間、礫耕栽培中に放出されるポプラの根の分泌物を活性炭に吸着させた後、アセトンで溶出し、アセトンを減圧濃縮後、残渣を酢酸エチルで抽出して酢酸エチル可溶区物を得た。得られた粗抽出物について LC-MS/MS 分析により、既知ストリゴラクトの調査を行った。また粗抽出物を HPLC により分画し、ヤセウツボ種子（*Orobanche minor*）に対する発芽刺激活性検定を行った。

粗抽出物を LC-MS/MS で分析した結果、これまでに確認された三環性の母核を持つ典型的な SL は検出されなかったが、SL の前駆体とされるカーラクトンの代謝産物であるカーラクトン酸とカーラクトン酸メチルが検出された。これまでにいくつかの植物の根浸出物からカーラクトン酸は確認されていたが、カーラクトン酸メチルが確認できたのはポプラが初めてである。また、粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび RP-HPLC により分画して発芽刺激活性を検定し、各活性画分を LC-MS/MS および GC/MS で分析した結果、ポプラは少なくとも 6 種類の新奇 SL の存在が示された。現在これら新奇 SL の構造解析を行っている。

Plant hormone, Strigolactone, Populus

講演番号：3A19a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A19 会場

New simple anti-ice nucleation assay

○ Anugerah Adhi LAKSANA, Shingo SUZUKI, Keita ARAKAWA, Yukiharu FUKUSHI (Hokkaido Univ.)

Anti-ice nucleation compound can be found in many natural sources including plants, microorganisms, insects, and fish. Recently our group reported anti-ice nucleation activity screening method of plant resources using leaf disk freezing assay and droplet freezing assay[1]. The aim of this study is to establish a new simple preliminary assay for anti-ice nucleation activity and to isolate active compounds. The new assay performed by cooling both sample and control droplets, with addition of *Erwinia ananas* as ice nucleator at -4 to -5ºC for 4 hours on top of silicon-coated aluminum foil film. The droplets (10 μL) which divided into three groups, negative control (*E.ananas*), positive control (*E.ananas* + epigallocathecingallate), and sample (*E.ananas* + extract). At this condition negative control group is frozen, while positive control group remain unfrozen during treatment. The activity of sample was then described by the number of unfrozen droplets compared to total number of droplets for each group. The extract of red perilla leaves (*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *purpurea*) showed anti-ice nucleation activity by droplet freezing assay[1], and it was confirmed that the leaf extract of red perilla and its methanol soluble fraction containing droplets remain unfrozen during our preliminary new assay. Currently, the optimization of assay condition and isolation of active compound from red perilla leaves are under investigation.

[1] Suzuki et, al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **81**, 2090 (2017)

anti-ice nucleation assay, red perilla, leaf disk freezing assay

発表責任者：福士幸治（y-fuku@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A19a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A19 会場

スリランカ産 *Spondias dulcis* 葉及び実に含まれる成分研究
Studies on the components contained in leaves and fruits of *Spondias dulcis* from Sri Lanka
○白井 青海[1]、石丸 幹二[1]、木村 祐太[1]、染谷 高士[2]、Wijesekara R.G.S.[3]、渡邉 啓一[1]（[1]佐賀大農、[2]アルビオン、[3]Wayamba Univ.）
○Seika SHIRAI[1], Kanji ISHIMARU[1], Yuta KIMURA[1], Takao SOMEYA[2], R.G.S. Wijesekara[3], Keiichi WATANABE[1] ([1]Saga Univ., [2]ALBION, [3]Wayamba Univ.)

［背景・目的］*Spondias* 属は 17 種から構成され、*Spondias dulcis*（Ambarella）は熱帯アジアに固有の植物であり、果実は広く各地域で伝統的に食用として使用され、これまでに、実・葉・樹皮において、抗糖尿病、抗酸化、抗炎症、抗菌作用などの様々な生理機能が報告されている。しかしながら、これらの生理機能成分の単離精製の報告はなされておらず、作用機構も明らかにされていない。そこで本研究では、Ambarella の生理機能成分の単離精製と作用機構解明の第一段階として、実及び葉から抽出した成分の単離精製と分析を目的とした。

［材料および方法］Ambarella の葉及び実を 70%エタノールで抽出し、粗抽出液とした。成分解析は、水溶性の低分子有機化合物を対象とした GC-MS 分析（Agilent 7890B GC-system×Agilent 5977A MSD）、COSMOSIL Cholester カラム（4.6 mm I.D. ×250 mm）を用いた HPLC 及び TLC（シリカゲル、展開溶媒；クロロホルム：メタノール：水＝6：6：0.7）により行った。粗抽出液からの成分の精製は、4 種のカラムクロマトグラフィー（充填剤：Diaion HP20、COSMOSIL 140C_{18}-OPN、TOYOPEARL HW-40、Sephadex LH-20）を組み合わせて行った。NMR 構造解析は VARIAN 400MHz を用いて行った。ラジカル消去活性の測定は DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）を用いて行った。

［結果と考察］GC-MS 分析の結果、葉に主要な成分はクロロゲン酸、未知成分、D-トレイトール、没食子酸、4-グアニジノ酪酸、実に主要な成分は L-アスパラギン、L-グルタミン酸、フラノース様成分、フルクトース、グルコース、スクロースであった。 HPLC 分析の結果、葉では主成分として 4 種のポリフェノール（P1-4）が認められ、それらの吸収スペクトルから、3 種（P1-3）はフェノール酸系、P4 はフラボノイド系のポリフェノールと推定された。実では葉に含まれるポリフェノール成分のうちの P2 と P4 が主成分として含まれていた。P2 と P4 の HPLC 溶出位置、紫外吸収スペクトル、TLC の展開パターンはクロロゲン酸及びルチンと一致した。またカラムクロマトグラフィーにより 520 g の生葉抽出物から 150 mg の P1 化合物が得られ、NMR 及び質量分析により、ネオクロロゲン酸と同定された。更に残り 1 種のポリフェノール P3 についても同様に精製、構造解析を行う。粗抽出液のラジカル消去活性を測定したところ、葉は実の乾燥重量当たり 2.9 倍の活性を有し、この活性は粗抽出液中の総ポリフェノール含量に相関していた。*Spondias dulcis* は抗糖尿病効果をもつと報告されているため、今後は、極性の高い糖質成分を含め単離した各成分の α-グルコシダーゼ阻害活性の評価を行う。

Spondias dulcis, polyphenol, antidiabetes

発表責任者：渡邉啓一（watakei@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3A19p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A19 会場

シモツケからのアルカロイドの探索と NGF 増強活性

Search for alkaloids from *Spiraea japonica* (Shimotsuke) and their NGF-enhancing activity

○奥村 祐太、長島 志栞、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yuta OKUMURA, Shiori NAGASHIMA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

当研究室では、これまで神経モデルである PC12 細胞を用いた神経成長因子(NGF)増強活性物質の探索を行っている。このような生理活性物質は神経変性疾患治療薬のリードになりうると期待できる。探索の過程で、バラ科植物シモツケから得られたアルカロイド画分が NGF 増強活性を有していることが分かったため、本研究ではシモツケのアルカロイド画分に着目し、NGF 増強活性を有する新規アルカロイドの探索を目的とした。

【方法・結果】

活性評価は次のように行った。すなわち、わずかに突起伸長を誘導する程度の極低濃度(0.8 ng/ml、約 15 %の突起伸長率)の NGF とサンプルを PC12 細胞に投与し、4 日間培養後、細胞の長径より長い神経様突起を持つ細胞の割合を計測することで、NGF 増強活性の指標とした。シモツケ（*Spiraea japonica*）の MeOH 抽出物を 0.2 N HCl と EtOAc で分配し、EtOAc 層から酸性・中性画分を得た。水層を pH 12 とし、$CHCl_3$ で抽出し $CHCl_3$ 層からアルカロイド画分を得た。また水層に生じた沈殿を濾過で集め不溶画分とした。各画分で NGF 増強活性試験を行った結果、アルカロイド画分のみに NGF 増強活性が確認された。このアルカロイド画分を TLC で分析しドラーゲンドルフ試薬で検出したところ 12 個の発色スポットが観察された。そこでフラッシュカラムにより分離を行ったところ、これまでに 2 種のアルカロイドと思われる物質の精製に成功した。NMR 解析の結果、ひとつは既知物の Spiradine F (図 1)であることが分かった[1)]。Spiradine F に対して NGF 増強活性試験を行った結果、12.5 μM で NGF 増強活性を示さず、25 μM 以上で毒性を示した。現在、活性本体の同定を目指してフラッシュカラム分離画分の NGF 増強活性を調べている。また、各アルカロイド化合物について単離、構造決定を進め、構造活性相関の検討も行う予定である。

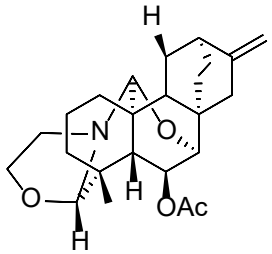


図 1　Spiradine F

【参考文献】

1）M. Toda, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett*. 5565 (1968).

Alkaloid, Neurite outgrowth, NGF-enhancing activity

講演番号：3A19p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A19 会場

フキおよびツワブキ由来高純度ピロリジジンアルカロイド試薬の開発および安定性調査
Development of high-purity reagent of pyrrolizidine alkaloids from Petasites japonicas and Farfugium japonicum, and the investigation of their stability.
○中塚 宏志、宮田 健吾、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Hiroshi NAKATSUKA, Kengo MIYATA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

ピロリジジンアルカロイド (PA)は、様々な植物中に含まれており、600 種類以上が知られ、その中でも 1,2-不飽和 PA は肝毒性を有するため、各国で分布調査や分析法の開発が進められている[1]。日本においては、古くから食されてきたフキやツワブキにも PA は含まれている[2]（図 1)。これらは、正しく調理すれば安全に食べられるとされるが、食の安全の重要性からより詳細な研究が望まれる。分解物や類縁体も含めた定量法の確立、PA の分布調査、調理法による除去率調査などが今後の課題となろうが、それらの研究を進めるためには、標準品となる高純度試薬が必要となる。しかし、フキに含まれる PA である Petasitenine (Fukinotoxin)および Neopetasitenine は、これまで試薬として市販されていなかった。恐らく、それら化合物の安定性が低い、天然原料中の含有量が少ないといった問題のためであると考えられる。そこで、我々はフキおよびツワブキを原料として、それらに含まれる PA 類を高純度試薬として安定供給することを目標として研究を進めた。

入手の容易さも考慮した原料探索、植物体における部位別濃度調査、化合物の安定性調査、および抽出・分離条件などの精製法検討の結果、PA 類を効率良く高純度に単離精製する手法を見出した。この手法を用いることで、フキより Petasitenine と Neopetasitenine を、ツワブキより Senkirkine を高純度に単離した。いずれも HPLC 分析において 98%以上の純度であった。フキ・ツワブキ由来 PA 類を高純度品試薬として安定供給する道を開けたと考えている。

加えて、得られた Petasitenine を用いて、溶液状態における安定性を調査した。その結果、用いる溶媒の種類によって分解速度が異なる結果が得られたため併せて報告する。

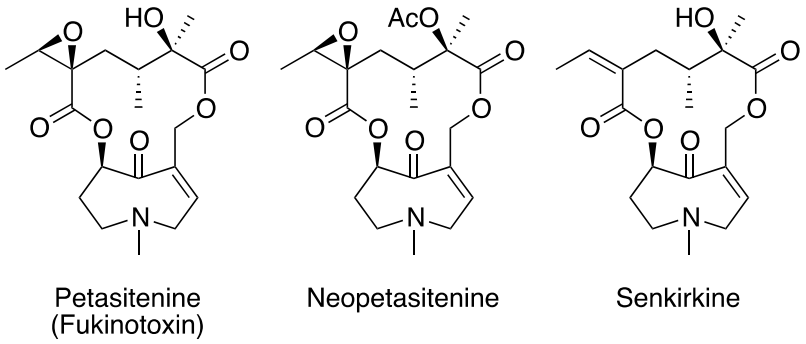


図1　フキ、ツワブキ由来ピロリジジンアルカロイドの構造

1) Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Pyrrolizidine alkaloids (PA), http://www.bfr.bund.de/en/pyrrolizidine_alkaloids__pa_-192924.html 2) Furuya, T. et al. *Chem. Phram. Bull.* **1976**, *24*, 1120–1122.; Hirata Y. et al., *Chem. Lett.* **1976**, *5*, 461–464.; Furuya, T. et al. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 3306–3307.

pyrrolizidine alkaloids, petasitenine, fukinotoxin

発表責任者：中塚宏志（nagara@nsgifu.jp）

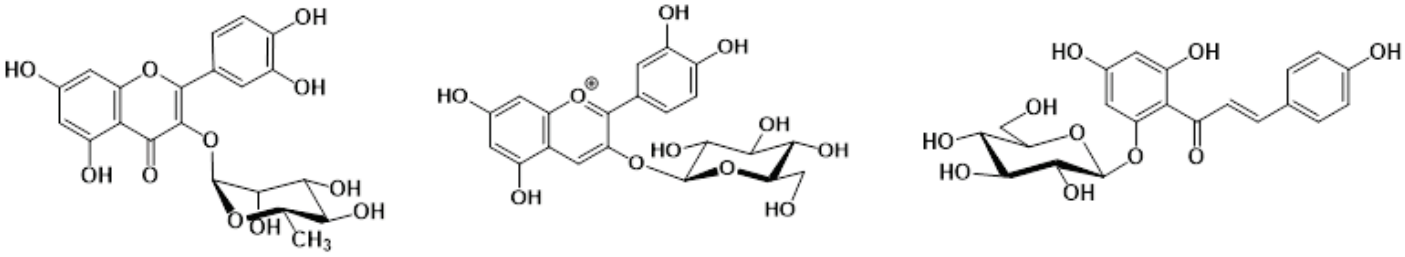
講演番号：3A19p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A19 会場

Analysis of flavonoid content in Oenothera's flower during senescence

○Yada TEPPABUT[1], Kin-ichi OYAMA[2], Tadao KONDO[1], Kumi YOSHIDA[1] ([1]Graduated School of Informatics, Nagoya University, [2]Research Institute for Materials Science, Nagoya University)

【Purpose】Flower of tsukimisou (*Oenothera tetraptera*) begins to bloom at night and fades in the morning. The full-blooming flower is white, and then the color is changed to red during senescence. Other *Oenothera* flowers, such as komasuyoigusa (*O. laciniata*) and matsuyoigusa (*O. stricta*) also change the color from yellow to orange during senescence[1]. Our research group is interested in this phenomenon of coloration. In this study, we analyzed the composition of the flavonoid components in *O. tetraptera*'s petals during flower senescence.

【Methods and Results】Petals of *O. tetraptera* obtained from the Kochi Prefectural Makino Botanical Garden were collected at 0, 4, 7 and 12 hours after blooming and extracted with acidic condition (3% TFA in 50% CH_3CN aq). The extract was analyzed using 3D-detected HPLC with Develosil RPAQUEOUS-AR-3 reverse phase column. In the white petal extract, flavonol derivative was detected. In the red petal extract, a peak of anthocyanin was observed with the flavonol. LC-MS analysis compared with authentic samples clarified that the flavonol was quercitrin, and anthocyanin was cyanidin 3-glucoside (Cy3G). During senescence, the content of Cy3G increased, whereas the content of quercitrin was not changed. The highest concentration of Cy3G, at 12 hours, was about 14 times lower than quercitrin. The same experiments were carried out using *O. laciniata* and *O. stricta* grown in Nagoya University. In both flowers, the amount of Cy3G was increased during senescence, but instead of flavonol, the chalcone glucoside, isosalipurposide, was detected in these flowers. The color change in all the three *Oenothera* flowers was clarified to be the de novo biosynthesis of Cy3G.



Quercitrin　　Cyanidin 3-glucoside　　Isosalipurposide

Scheme 1. The structure of petal components.

1. Weiss, M. R. & Lamont, B. B. *Isr. J. Plant Sci.* **45,** 185–199 (1997).

Oenothera, Petal color change, Cyanidin 3-glucoside

講演番号：3A19p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A19 会場

赤アズキ種皮に含まれる 2 種類の紫色色素の構造
Structure of two purple pigments of red adzuki bean

○永井 伸和[1]、数馬 恒平[2]、尾山 公一[3]、古賀 和司[4]、橋本 勝[5]、近藤 忠雄[2]、吉田 久美[2]([1]名大情報科学、[2]名大情報学、[3]名大物国セ、[4]名大生命農学、[5]弘前大農生)
○ Nobukazu NAGAI[1], Kohei KAZUMA[2], Kin-ichi OYAMA[3], Kazushi KOGA[4], Masaru HASHIMOTO[5], Tadao KONDO[2], Kumi YOSHIDA[2] ([1]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Info., Nagoya Univ., [3]RCMS, Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. Agr., Nagoya Univ., [5]Fac. Agr. Life Sci., Hirosaki Univ.)

【目的】我々はアズキ種皮に含まれ餡の紫色を担う色素の研究を行っている。すでに主色素 AZ-1(カテキノピラノシアニジン A(**1**))及び微量色素 AZ-2(同 B(**2**))の単離と相対構造を報告し、これらはカテキンとシアニジンが縮合した新規な骨格を持つことを明らかにした[1,2]。しかし、カテキン部分の絶対立体配置は不明であったので、今回、その決定を試みた。
【方法・結果】種々の機器分析と分解反応、誘導体化によって **1** の構造を決定した(図 **1**)。**2** は **1** の 2, 3 位の立体に関するジアステレオマーであることが分かった。カルボニル基の位置については ^{13}C NMR の化学シフトからカテキン部の 5 位と決定した。この構造は量子化学計算(ωB97X-D/6-31G*)の結果からも支持された。カテキン部の 2, 3 位の絶対立体配置は改良 Mosher 法による決定を試みた。モデル実験として(+)-カテキンを用いて改良 Mosher 法を適用したところ、2,3 位の絶対立体配置を正しく決定することが出来た(図 **2**)。**1** および **2** をそれぞれ光分解して得た分解物 A'(**3**)および B'(**4**)のフェノール性ヒドロキシ基をジアゾメタンによってメチル化した。今後これらのメチル化体を MTPA エステルへと誘導し、改良 Mosher 法を適用する予定である。さらに、色素の発色機構や安定性を解明するためにモデル化合物の合成を進めている。

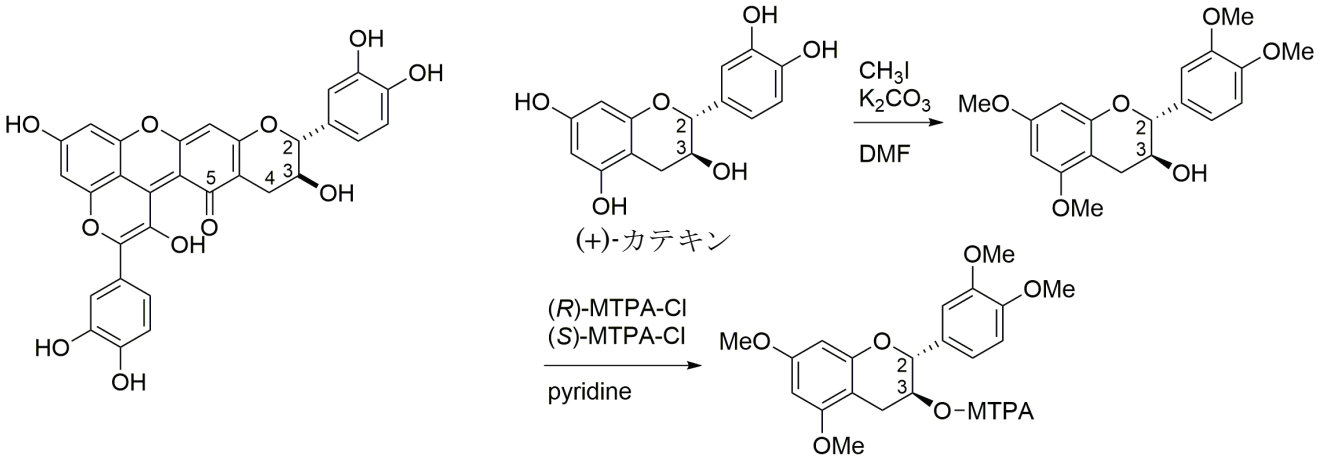


図 **1** カテキノピラノシアニジン A (**1**)の構造　図 **2** (+)-カテキンの Mosher エステルへの誘導化

1) 永井伸和他,日本農芸化学会 2017 年度大会. 2) 吉田久美他,第 59 回天然有機化合物討論会.

Vigna angularis, Modified Mosher Method, catechinopyranocyanidin

発表責任者：永井伸和（nobujm859@hotmail.co.jp）

講演番号：3A19p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A19 会場

機能性フラバン-3-オール誘導体の効率的生産に向けた検討と生物活性評価

Study for efficient production of functional flavan-3-ol derivatives and biological activity evaluation

○小堀 亮[1]、西村 拓哉[1]、宮形 知美[2]、恒川 昂平[2]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工・先端、[2]大阪電通大・工・環境、[3]立命館大・薬)

○Ryo KOBORI[1], Takuya NISHIMURA[1], Tomomi MIYAGATA[2], Kouhei TUNEKAWA[2], Takashi KAWASAKI[3], Akiko SAITOU[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

【目的】

フラバン-3-オール誘導体は様々な植物に含まれる無色、あるいは、淡褐色の機能性成分として知られ、日々大量に摂取する化合物群であることから様々な健康機能性が期待されている。しかしフラバン-3-オール誘導体はフェノール性水酸基の数や、立体の違い、修飾の有無などにより多くの類縁体が存在し、それらが植物体内に同時に存在することが多い。また、植物種によって含まれる化合物の系構造が偏っていることから、構造-活性相関研究が可能な構造のラインナップを同時に確保することが困難である。そこで我々は、これまでに有機合成の手法を用いて様々な構造を持つフラバン-3-オール誘導体を確保し構造-活性相関研究を進めてきた。その結果、微細な構造の違いが大きく生物活性に影響することを証明してきた。

本発表では、フラバン-3-オール誘導体を多く含むラズベリー、ブドウに注目し、生育段階や生育条件によるフラバン-3-オール誘導体量の変化の分析、および、ブドウ細胞を用いたフラバン-3-オール誘導体変換反応を試みたので報告する。

【方法・結果】

ラズベリーに関しては、品種や生育ステージにおけるによるフラバン-3-オール誘導体量の変化を追跡した。数種類(ヒンボートップ、スキーナトップ等)の果実を開花からの経過日数で 8 段階に分類して収穫し、それぞれのメタノール画分について HPLC、LCMS 分析を行った。その結果、標品との比較により(+)-catechin と(–)-epicatechin、および、それらが 2 量化した procyanidin B4 (Fig.1)が含まれていることが確認でき、procyanidin B4 は、果実の成熟に伴い含有量が減少することを確認した。現在、この化合物の変化が、フラバン-3-オール生合成関連酵素の発現と関係があるのか確認を進めている。

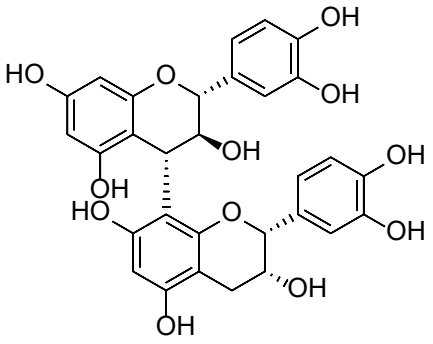


Figure 1. Procyanidin B4 の構造

また、ブドウ細胞 *Vitis vinifera L.*を用いてフラバン-3-オール誘導体の変換検討を試みた。アントシアニン色素を生産する VR 株、及び、生産しない VW 株で検討した結果、VW 株を用いたとき、(–)-epicgalloatechin-3-*O*-galalte から 2 量化したと考えられる化合物が得られた。

raspberry, vitis vinifera L, proanthocyanidin

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3A19p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A19 会場

ソテツリターからシアノバクテリアのホルモゴニア分化を誘導するビフラボン類の単離構造決定

Isolation and structural elucidation of hormogonia-inducing biflavone derivatives from cycad leaf litters

○橋床 泰之、西塚 紘明（北海道大学院農）
○Yasuyuki Hashidoko, Hiroaki Nishizuka (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】サンゴ状根と呼ばれる特殊な共生器官において藍藻類ネンジュモ（*Nostoc* sp.）と共生関係を構築するソテツは，共生成立のために幾つかのシグナル物質を放出すると考えられている。そのうち，*Nostoc* sp. のホルモゴニア（運動性の連鎖体）分化を誘導する化学因子として DGA やアナカルド酸エステルが我々の研究で見出されているが，ソテツにのみ見出される宿主特異的シグナル因子は見つかっていなかった。昨年の本大会において，幾つかのビフラボン類にホルモゴニア誘導活性を見出し，これらが裸子植物に特徴的な二次代謝産物であることを確認したことから，それらの推定構造と活性力価についての発表を行った。その後，活性本体をソテツ葉リターから十分量単離精製することに成功し，その構造を ^{1}H-NMR および 2 次元 NMR で解析し，プロトンとカーボンの完全帰属を含めて 2 種類のビフラボンの構造を明らかにすることができたので報告する。
［**方法・結果**］ 活性物質として得られたものは amentoflavone (3′-8″-biapigenin) として知られるフラボン 2 量体および apigenin 8 位と naringenin 7-*O*-位がカップリングしたフラボン-フラバノン 2 量体 8-(7”-O-naringeninyl)-apigenin をそれぞれ同定した。これらは単子葉植物に特異的とされるフラボン 2 量体として知られており，*Nostoc* 属シアノバクテリアと共生できるソテツ類に特徴的な二次代謝産物，特にフラボン類がホルモゴニア誘導に関わっていることを証明できたことは，窒素固定細菌と高等植物との共生系成立過程を考察する上で，極めて重要な意味を持つであろうと考えている。

hormogonia-inducing factor (HIF), biflavones, Cycas revoluta

発表責任者：橋床泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A20a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A20 会場

バクテリア由来 L-フコキナーゼ/GDP-L-フコースピロホスホリラーゼを用いた GDP-L-ガラクトースの高生産

Effective enzymatic synthesis of GDP-L-galactose using bacterial L-fucokinase/GDP-L-fucose pyrophosphorylase

○大橋 博之[1]、WAHL Claudia[2]、大橋 貴生[1]、ELLING Lothar[2]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大学生物工学国際交流センター、[2]アーヘン工科大学)
○ Hiroyuki OHASHI[1], Claudia WAHL[2], Takao OHASHI[1], Lothar ELLING[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]ICBiotech, [2]RWTH Aachen Univ.)

[背景及び目的]

L-フコース（L-Fuc、6-デオキシ-L-ガラクトース）は糖鎖の非還元末端に広く存在し、分子認識の標的分子として様々な生物学的機能に関わることが知られている。一方、分子アナログである L-ガラクトース（L-Gal）は希少糖であり、海洋生物由来サポニンや植物細胞壁の構成成分として報告されている。これらの L-Gal 残基は GDP-L-Gal をドナー基質として、 L-Gal 転移酵素により付加される。しかし GDP-L-Gal は市販されておらず、化学合成法および酵素法で調製が試みられている。酵素法では、GDP–D–マンノースから GDP-L-Gal を生成する、GDP-D-マンノース-3',5'-エピメラーゼ（GME）が用いられたが、GME の酵素学的特性に起因し、収率の向上が困難だった。そこで我々は、L-Gal の L-Fuc との構造類似性に着目し、L-フコキナーゼ/GDP-L-フコースピロホスホリラーゼ（FKP）を用いた GDP-L-Gal の簡便かつ高効率な酵素合成系の構築を目指した。

[結果]

FKP は、L-Fuc と ATP より L-Fuc 1-リン酸（L-Fuc 1-P）と ADP を生成するフコキナーゼ活性と、GTP と L-Fuc-1P より GDP-L-Fuc とピロリン酸を生成する GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ活性を有する二機能性の酵素であり、GDP 糖のワンポット合成が可能である。組換え FKP を大腸菌を用いて生産し、L-Gal を FKP の基質として反応を行ったところ、GDP-L-Gal が生成された。そこで、GDP-L-Gal の生成条件を最適化するため、pH、二価カチオン、温度、基質濃度、酵素濃度について検討を行った。さらに、GDP-L-Gal の精製条件を検討し、アルカリホスファターゼ処理、陰イオン交換カラム、及び有機溶媒沈澱を用いることで、酵素反応溶液より全収率 92.0%で GDP-L-Gal が精製できた。

[展望]

FKP は、GDP-L-Gal をはじめとする、GDP-L-Fuc の構造類縁体の生産に効果的だと考えられる。今回、GDP-L-Gal の容易に入手可能となったことで、今後、L-Gal を含む新規化合物や、未知の L-Gal 転移酵素の発見などが期待される。

FKP, GDP-L-fucose, GDP-L-galactose

講演番号：3A20a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A20 会場

Prevotella melaninogenica 由来の糖タンパク質糖鎖遊離酵素の精製と性質およびその遺伝子発現系の構築と発現酵素の性質

Purification and characterization of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM from *Prevotella melaninogenica* and functional expression of the gene

竹内 朋史、高谷 尚弥、○伊藤 和央 (阪市大院・理)
Tomohumi TAKEUCHI, Naoya TAKATANI, ○Kazuo ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】我々は、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生菌を各種動物から探索し、産生酵素の解析と開発ならびに産生菌の糖鎖異化機構を調べている。これまでヒトより複数のエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生菌を分離し、同定してきた。これらはすべて *Prevotella* 属菌と同定され、産生酵素をエンド PB、エンド Psp. およびエンド PM と命名した。いずれも菌体結合型酵素で、多分岐コンプレックス型糖鎖を遊離する。そして、エンド Psp. には存在様式の異なる複数の分子種が存在し、糖鎖構造特異性が異なることを明らかにしてきた。本研究では、*P. melaninogenica* の産生するエンド PM を精製し、糖鎖構造特異性を調べるとともに同酵素の遺伝子発現系を構築し、発現酵素の糖鎖構造特異性について検討した。
【方法】酵素活性は、糖タンパク質を基質として測定した。遊離糖鎖の分析は、TLC および質量分析計によって行った。遺伝子発現系は、大腸菌における発現系を用いて構築した。
【結果および考察】エンド PM 活性は *P. melaninogenica* の増殖に依存して上昇した。菌体からエンド PM を可溶化後、種々カラムクロマトグラフィーで精製した。得られたエンド PM 標品は至適 pH6 付近で、native なヒトトランスフェリン、ヒトラクトフェリン、ヒトα_1-酸性糖タンパク質、ウシフェツイン、ヒツジ IgG、RNase B およびオボアルブミンから糖鎖を遊離した。菌体結合状態の酵素も同様であった。また、精製エンド PM はこれら糖タンパク質由来の糖アスパラギンからも糖鎖を遊離した。一方、エンド PM には 3 つの遺伝子が存在し、各遺伝子産物を上流よりエンド PMα、エンド PMβ、エンド PMγとし、いずれもクローニングした。そのうち、エンド PMα遺伝子の発現系を構築した。組換えエンド PMαは可溶性酵素として発現し、精製標品は SDS-PAGE で単一であった。組換えエンド PMαは、native なヒトトランスフェリン、ヒトラクトフェリン、ヒトα_1-酸性糖タンパク質、ウシフェツイン、ヒツジ IgG、から、2 本鎖、3 本鎖あるいは 4 本鎖コンプレックス型糖鎖を遊離した。一方、RNase B やオボアルブミンからの糖鎖遊離は認められなかった。このため、エンド PM には 3 つのアイソザイムが存在し、エンド PMαは、末端 Sia、bisecting GlcNAc、コア Fuc の存在に関わらず、糖タンパク質から 2～4 本鎖コンプレックス型糖鎖を特異的に遊離し、エンド PMβあるいはエンド PMγはさらにハイマンノース型糖鎖も遊離するものと考えられた。また、native な糖タンパク質から 2、3、4 本鎖コンプレックス型糖鎖を遊離する酵素は *Prevotella* 属菌に特徴的であることが示唆された。さらに、エンド PM は native な糖タンパク質のコンプレックス型糖鎖除去・導入に有用な酵素と考えられた。

Prevotella melaninogenica, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase　PM, endo PM

講演番号：3A20a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A20 会場

The role of *N*-linked glycosylation in the secretion and enzymatic stabilities of *Chamberlinius hualienensis* hydroxynitrile lyase expressed in *Pichia pastoris*

○Aem NUYLERT[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref, Univ., [2]ERATO, JST)

[Purpose**]** Hydroxynitrile lyase (HNL) is a valuable enzyme in the synthesis of optically pure cyanohydrins which are important synthetic intermediates for fine chemical and pharmaceutical industry. The HNL from millipedes, *Chamberlinius hualienensis* (Diplopoda: Paradoxosomatidae) or ChuaHNL was reported to be a novel source of *R*-HNL by our laboratory and showed not only the highest specific activity but also high enantioselectivity in the synthesis of various cyanohydrins.[1] For the enzyme stability properties, ChuaHNL has the wide temperature and pH stabilities, might be involed by the post translational modification such as glycosylation. Since ChuaHNL consisting of three glycosylation sites, we expected that *N*-glycosylation of recombinant ChuaHNL in *P. pastoris* may also contribute on the catalytic and/or enzyme stabilities.

[Materials and Methods**]** In order to study the effect of glycan on enzyme activity, the wild-type ChuaHNL expressed in *P. pastoris* was treated with glycosidase F (PNGaseF) to remove the glycan on the protein molecule under the undenature condition. To identifiy the glycosylation site, we used codon optimized ChuaHNL cDNA as a template to reconstruct for removing the glycosylation site at N99Q, N109Q and N123Q. The characteristic of glycosylated mutant on enzyme secretion, stability on pH, temperature and solvent were compared with the wild-type.

[Results**]** The glycans on ChuaHNLcould be removed after treating with PNGaseF and does not effect the enzyme activity. HNL production and activity of mutants were lower than that of wild-type. Each of mutants (N109Q and N123Q) showed lower molecular mass than that of wild-type indicating that the both site are glycosylated. The wild-type ChuaHNL showed much better pH stability and thermostability than the mutants removed *N*-glycosylation site. It is considered that the stabilization of wild-type ChuaHNL may be due to the effect of glycosylation.

[1] M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto, Y. Asano, *PNAS,* **2015**, *112*, 10605-10610.

Hydroxynitrile lyase, Millipedes, Glycosylation

発表責任者：Prof. Yasuhisa Asano（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3A20a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A20 会場

ERp29 が媒介する小胞体内在レクチンシャペロンのダイマー形成
Dimerization of ER resident lectin chaperone mediated by ERp29

○中尾 仁美[1]、瀬古 玲[2]、伊藤 幸成[3]、迫野 昌文[1] ([1]富山大院理工、[2]JST, ERATO、[3]理研)
○Hitomi NAKAO[1], Akira SEKO[2], Yukishige ITO[3], Masafumi SAKONO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Educ.,Univ. Toyama, [2]JST, ERATO, [3]RIKEN)

【緒言】レクチン型分子シャペロン calnexin (CNX) および calreticulin (CRT)は、小胞体における新生糖タンパク質管理機構において重要な役割を果たす。CNX および CRT は PDIs (Protein disulfide isomerase family proteins) のひとつである ERp57 と複合体を形成し、協同的に糖タンパク質のフォールディングを行っていると考えられている。我々はこれまでに CNX および CRT が ERp57 と同様に ERp29 とも相互作用することを見出した[1,2]。ERp29 の機能はいまだ明らかとなっていないが、ERp29 は通常二量体で存在することから、複合体中において ERp29 は CNX, CRT を連結するリンカーとして機能することが予想される。そこで本研究では、CNX-ERp29 複合体中における ERp29 の機能的役割について検討を行った。
【方法】 PCR および制限酵素法を用いて c-Myc 融合 CNX タンパク質(c-Myc CNX) をコードするプラスミドベクターを作製し、大腸菌タンパク質発現系により、c-Myc CNX を調製した。c-Myc CNX の検出は anti-c-Myc 抗体を用いて行った。同様に、二量化しない ERp29 として ERp29 D ドメインの調製を行い、Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3) を用いたクロスリンク実験および SDS-PAGE により二量化形成の評価を行った。CNX 固定化粒子を分散した溶液に ERp29 または ERp29 D ドメインと c-Myc CNX を共存し、pull down assay を実施した後、c-Myc CNX の検出を行った。
【結果と考察】western blot より、調製した c-Myc CNX に対する anti-c-Myc 抗体の結合が示された。一方、タグを導入していない CNX に対しては抗体の結合が認められなかったことから、c-Myc 特異的な検出であることが示された。また、ERp29 のクロスリンク実験より、ERp29 は二量体が確認されたのに対して、ERp29 D ドメインは二量化が認められなかった。CNX 固定化粒子により pull down assay およびドットブロットを実施した結果、ERp29 共存条件において c-Myc の強いシグナルが検出されたことから、CNX 固定粒子は c-Myc CNX と相互作用したことが示唆された。一方で、ERp29 D ドメイン共存条件では c-Myc のシグナルがほとんど検出されなかったことから、粒子固定 CNX と c-Myc CNX の相互作用が ERp29 二量体を介して行われている可能性が示された。この結果より、ERp29 二量体が 2 つの CNX を連結するリンカーとして機能することが示唆された。

1) M. Sakono et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 452 (2014) 27-31
2) H. Nakao et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 487 (2017) 763-767

ER resident chaperone, ERp29, Protein disulfide isomerase

発表責任者：迫野 昌文（msakono@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3A20a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A20 会場

精密分子プローブを用いたゴルジ体における新規 *N*-結合型糖鎖修飾プロセシング経路の解明

Elucidation of novel *N*-glycan processing process in Golgi apparatus using rigorous molecular probes

○三浦 一輝[1]、小野寺 千尋[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)

○Kazuki Miura[1], Chihiro Onodera[2], Wataru Hakamata[1,2], Takako Hirano[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾の 1 つである *N*-結合型糖鎖修飾は、糖質加水分解酵素と糖転移酵素により行なわれる。本糖鎖修飾は小胞体から開始され、その修飾は全て加水分解反応であり、基質糖鎖の非還元末端はすべて α-結合である。また、小胞体にはフォールディング不全のタンパク質上の糖鎖に対して、糖転移反応により糖を付加し一段階前の修飾過程に戻す、通常の修飾経路とは異なる逆行修飾過程が存在する。次の修飾の場であるゴルジ体では、末端が α-結合の場合は加水分解反応または糖転移反応、β-結合の場合は糖転移反応のみで修飾が進行し、逆行修飾過程は存在しない。そこで、ゴルジ体にも小胞体に存在するような逆行修飾過程が存在する、つまり糖鎖末端が β-結合のときも加水分解反応による修飾が生じると仮定し、糖鎖末端の β-結合を加水分解するゴルジ体 β-グリコシダーゼの探索および糖鎖修飾におけるこれら酵素の役割解明を研究目的とした。

【方法と結果】ゴルジ体における *N*-結合型糖鎖修飾過程では、β-ガラクトシド結合および β-*N*-アセチルグルコサミニド結合が出現する。そこでこれら結合を加水分解する β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) および β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (β-GlcNAc) の存在を仮定し、探索を試みた。まず、*N*-結合型糖鎖修飾に関与する加水分解酵素の活性部位における基質認識の特徴を *in silico* シミュレーションで解析し、これら結果に基づいて仮定した β-Gal および β-GlcNAc の細胞内活性イメージング可能な蛍光基質を精密分子設計し合成した。合成した蛍光基質をヒト細胞へ投与し仮定した酵素の探索を行った結果、ゴルジ体に新規な β-Gal 活性、リソソームに既知の β-GlcNAc 活性を見出した。これまでの研究から、ヒト細胞の β-Gal 遺伝子は GLB1 のみが報告されており、1 つはゴルジ体および小胞体に局在し、細胞内での β-Gal 活性の報告がない full precursor GLB1 (fpGLB1) であり、fpGLB1 がタンパク質プロセシングを受けリソソームへ輸送され β-Gal を有する GLB1 isoform 1 となる。1 つは、核周辺に局在する GLB1 isoform 2 であり、β-Gal 活性を持たないことが報告されている。そこで発見した新規 β-Gal 活性は fpGLB1 に由来すると考え、蛍光基質の構造に基づいた光親和性プローブを設計・合成し、それを用いた光親和性標識法により fpGLB1 の検出を試みた。その結果、fpGLB1 特異的なアミノ酸配列を含むペプチド断片が高い信頼性に基づいて検出された。

これらの研究結果より、我々は fpGLB1 が *N*-結合型糖鎖の β-ガラクトシド結合を加水分解する逆行修飾に関わることを提唱している。現在は、fpGLB1 が糖鎖修飾に関与するか明らかとするため、fpGLB1 の細胞内機能解析に利用可能な阻害剤の探索を試みている。

N-glycan processing, fluorescent imaging, photoaffinity labeling

発表責任者：袴田航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A20a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A20 会場

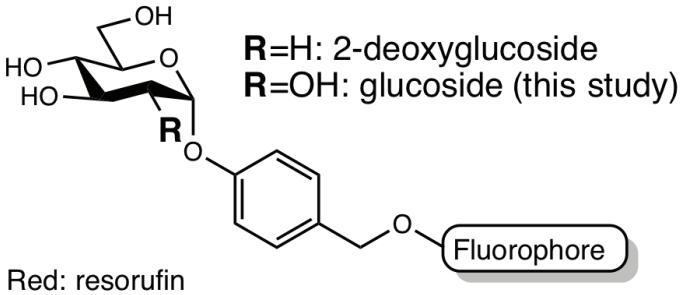
小胞体グルコシダーゼ II 特異的蛍光基質の合成とヒト培養細胞での評価

Synthesis and evaluation of a fluorescent specific substrate for Endoplasmic reticulum glucosidase II in human cultured cells

○熊谷 理、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Osamu KUMAGAI, Wataru HAKAMATA, Takako HIRANO, Toshiyuki NISHIO (Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】小胞体グルコシダーゼ II （ER GII）は、*N*-結合型糖鎖合成の初期段階を司り、新生糖タンパク質の品質管理に関与する。また、ER GII の阻害は抗ウイルス薬・抗腫瘍薬・アルツハイマー病等の治療薬としての可能性が示されている。しかしながら、GII はヘテロダイマー構造のため酵素活性を有したままの単離や分子生物学的手法を用いた調整も困難であり、その報告もない。そのため、活性を有したヒト由来 GII を研究に用いるには、ヒト細胞そのものを用いざるを得ないのが現状である。これまでに当研究室では、GII が GH31 ファミリーに属していることから、他の GH31 α-glucosidase と同様に 2-deoxyglucosidase (2D) 活性を有していると考え、ラット小胞体画分を酵素源とし、GII に 2D 活性を見出し報告した。次に、2-deoxyglucopyranoside を構成糖とする蛍光基質（下図、R=H の基質）を開発し、ヒト培養細胞を酵素源とした GII 活性の検出を行った。しかし、本蛍光基質を用いて得られた阻害を投与したヒト細胞の糖鎖解析を網羅的に行った結果、高マンノース糖鎖の蓄積が観察された。この結果は、用いた阻害剤がマンノシダーゼを阻害したことを示している。そこで、GII 本来の基質構造であるグルコースを構成糖とした GII 蛍光基質であれば、より GII への特異性が高い蛍光基質となりうると考え、グルコースを構成糖とする蛍光基質（下図、R=OH の基質）の *in silico* 解析による評価・合成・培養細胞での評価を行うこととした。

【方法・結果】設計した蛍光基質の *in silico* マウス由来 ER GII の立体構造 (PDB ID: 5IEE) を用いて評価した結果、タイトな酵素活性部位に対して設計した蛍光基質が適切に結合するモデルが得られたため、GII 基質として妥当な構造であると評価した。次に、Penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranose を出発原料とし、カーン・グリコシル化法により α-グルコシドを合成した。得られた化合物のエステルを還元しベンジルアルコールとした後、蛍光団を光延反応で結合することにより目的とする青・緑・赤色の蛍光基質のアセチル体を 11 工程で合成した。合成したこれら 3 種類の新規 GII 蛍光基質を培養細胞に投与し、ER GII の基質として機能するか、これまでの基質に比べ特異性が向上しているかの評価を行なっている。



特異性の向上を目指した GII 蛍光基質の構造

α-glucosidase II, specific substrate, synthesis

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A20a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A20 会場

In vitro で発現した Glycoside Hydrolase Family 47 に属する蛋白における S-S 結合の形成

Formation of S-S bond in proteins of Glycoside Hydrolase Family 47 using in vitro expression sytem

○相川 順一、伊藤 幸成（理研）
○Junichi Aikawa, Yukishige Ito (RIKEN)

＜目的＞

アスパラギン結合型糖鎖(*N*-glycan)を持つ糖タンパク質は、粗面小胞体（ER）における品質管理機構により機能的なものが選別され、最終的に細胞外や細胞表層などに輸送される。一方、不適切な折りたたみをされたと判断された糖タンパク質は ER-associated degradation により、細胞質に移行し、その後分解される。ここで、ER における糖タンパク質の *N*-glycan はハイマンノース型であり、それらは Glycoside Hydrolase Family 47(GH47)に属する蛋白によっても認識、切断されると考えられる。

そこで、本研究では、GH47 に属するタンパク質のうち、ER degradation-enhancing mannosidase-like protein (EDEM)がハイマンノース型 *N*-glycan を有する糖タンパク質と相互作用する機構を探求するため、組換え型 EDEM を調製することを目的とした。昨年度の大会では、得られた EDEM においては S-S 結合がランダムにかかり、多様な分子種が生じていることがわかった。そこで、今回 S-S 結合形成に関わる酵素の添加により、単一の分子種の生産を目指したので、報告する。

＜方法＞

Trx 及び DsbA をそれぞれ再構成型無細胞タンパク質合成系で発現させた溶液に、引き続き EDEM の鋳型を含む反応液を加え、タンパク質合成系を続行した。得られた反応液の可溶性画分から、ポリペプチドをアフィニティー精製した。

＜結果＞

Trx 及び DsbA は再構成型無細胞タンパク質合成系により、目的の分子量のポリペプチドが発現できた。これらを単独で、あるいは混合した溶液に EDEM 発現用の反応液を加えて、最終的な反応液とした。得られた EDEM ポリペプチドは単一の分子種には収束していなかった。さらに、得られた EDEM ポリペプチドを TALON 磁気ビーズに保持させて酵素源としたものには、現在までに活性の検出がみられなかった。現在、他の S-S 結合形成に関わる酵素の添加をを試みている。

[1)] *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012); *J. Biochem.* **155**, 375-384 (2014)

Glycoside Hydrolase, ER-associated degradation, N-glycan

発表責任者：相川　順一（aikawa@riken.jp）

講演番号：3A20a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A20 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における α 1,2-マンノシダーゼ欠損株の性状解析
Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* α1,2-mannosidase gene mutants
○菊間 隆志、相川 順一、伊藤 幸成（理研）
○Takashi KIKUMA, Junichi AIKAWA, Yukishige ITO (RIKEN)

【目的】粗面小胞体（ER）におけるタンパク質品質管理機構では、アスパラギン結合型（*N* 型）糖鎖が重要な役割を担う。すなわち、分泌タンパク質のほとんどが小胞体において *N* 型糖鎖が付加され、この構造を他の因子が認識して分泌経路に進むか、未熟タンパク質として分解されるかの判断材料とする。まず *N* 型糖鎖は ER 内で新生ポリペプチドに Glc3Man9GlcNAc2 の構造で付加される。次にフォールディングが適切に行われたタンパク質はグルコースがトリミングされ分泌経路に進むが、適切に行われなかったタンパク質はグルコースに加えマンノースがトリミングされ、ER 関連タンパク質分解（ER-associated protein degradation: ERAD）によりプロテアソームで分解される。マンノースの α1,2 結合を切断する α1,2-マンノシダーゼがこのトリミングを担っており、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては Mns1、Htm1、Mnl2 が存在する。これらの α1,2-マンノシダーゼにより ER 内でフォールディングが適切に行われなかった糖タンパク質の *N* 型糖鎖が Man6GlcNAc2 もしくは Man5GlcNAc2 までトリミングされると考えられる。本研究は、*S. cerevisiae* における α1,2-マンノシダーゼ機能の生理的意義および *N* 型糖鎖構造との関係を解明することを目的とし、*S. cerevisiae* の α1,2-マンノシダーゼをコードする遺伝子破壊株の解析を行った。
【方法及び結果】*S. cerevisiae* において小胞体 α1,2-マンノシダーゼをコードする *MNS1*、*HTM1*、*MNL2* をすべて破壊した *mns1*Δ*htm1*Δ*mnl2*Δ 株を作製した。この株を YPD 寒天培地で培養し、コントロール株と生育を比較したところ、顕著な差は観察されなかった。また、小胞体ストレスに対する感受性を検討するため、*mns1*Δ*htm1*Δ*mnl2*Δ 株を YPD 寒天培地に DTT もしくはツニカマイシンを添加した培地で培養した。その結果、DTT を添加した培地では生育においてコントロール株との差は見られなかったが、ツニカマイシンを添加した培地ではコントロール株と比較して若干の生育阻害が観察された。
現在、この株のミクロソーム画分を抽出し、Man9GlcNAc2-BODIPY を基質とした *in vitro* アッセイを行い、α1,2-マンノシダーゼ欠損の *N* 型糖鎖構造に与える影響を検討している。また、*MNS1*、*HTM1*、*MNL2* に加え、液胞 α1,2-マンノシダーゼをコードする遺伝子 *AMS1* を破壊した 4 重破壊株を作製し、同様の検討を行う予定である。

α 1,2-mannosidase, ERAD, *N*-glycan

講演番号：3A20a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A20 会場

N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをノックアウトした HBV 生産細胞の解析
Analysis of N-acetylglucosaminyltransferase-deficient hepatocytes expressing Hepatitis B virus
○鈴木 優矢、三崎 亮、岩崎 将士、大橋 貴生、藤山 和仁（大阪大 生工国際セ）
○Yuya SUZUKI, Ryo MISAKI, Masashi IWASAKI, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA (Osaka Univ.)

【背景・目的】
ウイルス感染は生命にとって脅威となる存在である。一般的にウイルスは細胞膜に存在する受容体に結合し、エンドサイトーシスにより輸送され細胞内へと侵入する。その後ウイルスは宿主細胞を利用し複製する。複製されたウイルスは細胞外へと放出され次の細胞へと感染し拡大していく。中でも、B 型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus: HBV）によって引き起こされる B 型肝炎は世界中で多く感染者が存在しているが、ウイルスの感染、侵入、複製、放出などの分子メカニズムが未解明であるため、いまだ完治に至る治療法が確立されていない。B 型肝炎の完治療法を確立するためには、ウイルスライフサイクルのメカニズムの解明が必要不可欠となる。近年、インフルエンザウイルスの感染機構に代表されるように、ウイルス感染には糖タンパク質糖鎖が深く関与していることが分かってきた。本研究では、HBV 表面抗原の糖鎖構造に着目し、HBV 生産細胞（HepAD38）の糖鎖修飾関連酵素をノックアウトした糖鎖改変 HBV 生産細胞の構築を目指した。最終的に、得られた糖鎖改変 HBV 粒子のヒト肝細胞への感染性を評価することで、糖鎖構造の違いによる HBV 感染への影響を調べる。
【方法】
HepAD38 の複合型糖鎖合成を阻害するため、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて標的糖転移酵素 *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 1（GnT1）遺伝子のノックアウト株を樹立した。まず、GnT1 遺伝子ノックアウト用ベクターを構築し、HepAD38 株に導入後、細胞を限界希釈することで単一クローン株を取得した。次に、単一クローン株より調整したタンパク質に対しレクチン染色を行うことで、複合型糖鎖合成不全株を選抜した。最終的にゲノム塩基配列を確認し、GnT1 欠損 HepAD38 株を取得した。変異株より全可溶性タンパク質を抽出したのち、PNGase F を用いて糖鎖を遊離させた。糖鎖を 2-アミノピリジンを用いて蛍光標識した後、逆相高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析器を用いて糖鎖構造を解析した。
【結果】
糖鎖構造解析の結果、野生株で検出された複合型糖鎖は変異株で確認することができず、糖鎖構造がハイマンノース型に収束していることが確認できた。本研究にて構築した GnT1 欠損 HepAD38 株を生産宿主とすることで、糖鎖構造を改変した HBV 粒子の作製が可能となり、HBV 感染経路あるいはライフサイクルにおける糖鎖の機能を解明する実験系を構築できた。

N-glycan, N-acetylglucosaminyltransferase1, Hepatitis B virus

講演番号：3A20a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A20 会場

フコース結合型糖鎖の合成に関わる酵素を失った CHO 細胞の解析

Analysis of CHO cells without enzymes relating to fucosylation of glycans

岩崎 将士、○三崎 亮、大橋 貴生、藤山 和仁（大阪大　生工国際セ）
Masashi IWASAKI, ○ Ryo MISAKI, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA (Osaka Univ. ICBiotech)

【背景および目的】

糖タンパク質の糖鎖はタンパク質の安定性や生理活性に影響を及ぼすこと、構造の違いが免疫原性をもたらすことが知られており、糖鎖構造がタンパク質の機能と品質に大きく貢献する要因となっている。ところが、バイオ医薬品をはじめとする組換えタンパク質生産のプラットフォームであるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞では、タンパク質の品質面で好ましくない糖鎖修飾が起こる場合がある。そのため、生産物に生物学的活性を十分に発揮させるため、宿主 CHO 細胞の糖鎖修飾経路を遺伝子工学的に改変し、生産物に対して糖鎖構造分布を有利な方向へシフトさせることは有効な手段といえる。

近年の市場成長が著しい抗体医薬品は、主に CHO 細胞を宿主として生産される糖タンパク質である。抗体 Fc 領域に付加した *N*-結合型糖鎖の α1,6-フコース残基を除去することで、抗体依存性細胞傷害活性が大幅に向上することが知られている。したがって、フコース結合を合成できない CHO 細胞を構築できれば、付加価値の高い抗体医薬品生産の有用宿主となり得る。そこで先行研究において、フコース結合型糖鎖合成に関わる遺伝子をノックアウトした CHO 細胞を樹立した。しかしながら、血清存在下で培養したノックアウト細胞では、野生型と比較して顕著に減少したものの *N*-結合型糖鎖へのフコース結合が認められた。この原因として、血清含有培地からのフコースの持ち込みが考えられた。この問題を確かめるために、本研究では上記ノックアウト細胞を無血清培地へ馴化し、その性質を解析した。

【方法および結果】

先行研究において樹立した、糖鎖へのフコース転移に必要な供与体基質の合成酵素遺伝子をノックアウトした単独破壊株および当該基質をゴルジ体内腔へ輸送するタンパク質の遺伝子をノックアウトした二重破壊株 CHO 細胞を無血清培地へ馴化した。次に、無血清培養した細胞より可溶性タンパク質を調製し *N*-結合型糖鎖構造を解析した。血清培養した細胞の糖鎖構造と比較したところ、無血清培養によって単独破壊株のフコース結合型糖鎖含量が大きく減少することが分かった。さらに、二重破壊株ではフコース結合型糖鎖の存在は検出限界以下であった。本研究結果から、CHO 細胞が血清培地から糖鎖修飾に利用できる糖基質を取り込んでいることが示唆された。

N-glycan, fucosylation, Chinese hamster ovary

講演番号：3A20a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A20 会場

ヒト細胞に発見した新規β-ガラクトシダーゼの阻害剤探索と機能解明

Screen and functional analysis of novel β-galactosidase discovered in human cells

○小野寺 千尋[1]、三浦 一輝[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科）
○Chihiro ONODERA[1], Kazuki MIURA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Gruduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾の１つである *N*-結合型糖鎖修飾は、*N*-結合型糖鎖修飾は小胞体から開始され、*exo* 型加水分解酵素と糖転移酵素がその修飾を行なっている。小胞体での糖鎖修飾は、*exo* 型加水分解酵素による加水分解反応のみであり、その基質の非還元末端はすべて α-結合である。次のゴルジ体で行われる糖鎖修飾は、糖鎖の非還元末端が α-結合の場合、 *exo* 型の加水分解と糖転移がなされるが、β-結合の場合は糖転移のみが認められる。そこで、非還元末端が β-結合の場合にも *exo* 型の加水分解が行われる考え、ゴルジ体において *N*-結合型糖鎖の非還元末端の β-結合を *exo* 型に加水分解する “*exo* β-glycosidase” の探索を行った結果、ゴルジ体に新規 β-ガラクトシダーゼ活性を見出し（K. Miura *et al*, *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1369, 2016）、光親和性標識法を用いてその酵素活性がヒト唯一の β-ガラクトシダーゼ遺伝子である GLB1 に由来する完全長前駆体 β-ガラクトシダーゼ (fpGLB1) であることを提唱し、その活性がゴルジタ体における *N*-結合型糖鎖の逆行修飾の可能性を提示した（K. Miura *et al*, *Biosci. Biotech. Biotechnol. submitting*）。しかしながら、光親和性標識法による fpGLB1 のカバー率は 30% 程度であり、より決定的な証拠および今後の fpGLB1 の機能解明のためには、fpGLB1 に高い親和性を示す化合物、すなわち fpGLB1 の阻害剤が必要となる。そこで、化合物ライブラリから β-ガラクトシダーゼに対する阻害剤探索を行い、得られた阻害剤を用いて fpGLB1 の単離・同定および機能解明を行うことを目的とした。
【方法と結果】化合物ライブラリから阻害剤をスクリーニングするためには、迅速に大量の化合物をアッセイする必要がある。はじめに、HeLa 細胞のライセートおよび *N*-結合型糖鎖を基質とする市販の β-ガラクトシダーゼ（*Streptococcus pneumoniae* 由来）と開発した蛍光基質を用いて、*in vitro* で酵素活性の測定を行なったが、両方法ともに活性を検出することができなかった。そこで、96 穴プレートを用いて阻害剤のスクリーニング系を構築することとした。アッセイ系は、96 穴プレートへ HeLa 細胞を培養し、そこへ開発した蛍光基質を加え、インキュベートに蛍光量を測定した。その結果、CV 値が 10% 以下であったため、阻害剤スクリーニング系として適した精度を有するアッセイ系であることを確認した。本系を用いて阻害剤スクリーニングを行なった結果、十数種類のヒット化合物を得た。現在は、最終ヒット化合物の選定を行うとともに、トシルケミストリーを採用したプローブの設計と合成を行なっている。最終ヒット化合物が選定でき次第、ヒット化合物をプローブに組み込み、fpGLB1 の単離と同定を行う予定である。

β-galactosidase, inhibitor, screening

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

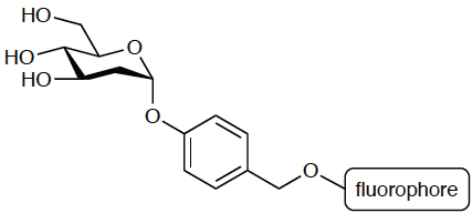
講演番号：3A20a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A20 会場

抗ウイルス剤を目指した多様な母核を有する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索

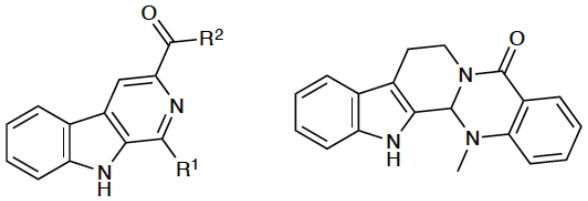
Screen for endoplasmic reticulum glucosidase II inhibitors with various backbone for antiviral drugs

○恩田 桃子[1]、東田 彩花[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化）
○Momoko ONDA[1], Ayaka HIGASHIDA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】近年、新興・再興ウイルス感染症が世界的な問題となっている。しかし、ウイルス感染症に対する市販薬は少なく抗ウイルス剤は限られており、様々なウイルス感染症に対応可能な抗ウイルス剤が強く求められている。ウイルスがヒトへ感染する際には、ウイルス表面の *N*-結合型糖鎖とヒト細胞の表面糖鎖の相互作用が重要であり、ウイルスの *N*-結合型糖鎖修飾過程を阻害し未成熟な糖鎖を持つと感染力が大幅に低下することに着目した。そこで、この *N*-結合型糖鎖修飾の初期段階に関与し、抗ウイルス剤の標的酵素として報告例が多い小胞体グルコシダーゼ II (GII) を標的酵素とした。これまでに我々は、培養細胞において GII の酵素活性を検出可能な蛍光基質（下図）を開発した。本研究では、様々な骨格を有する GII 阻害剤を得るために、開発した蛍光基質と培養細胞を用いて、別の化合物ライブラリから GII 阻害剤のスクリーニングを行うことを目的とした。
【方法・結果】化合物ライブラリから阻害剤をスクリーニングするためには、迅速に大量の化合物をアッセイする必要がある。そこで、96 穴プレートを用いて阻害剤の高速スクリーニング系を構築することとした。アッセイ系は、96 穴プレートへ HeLa 細胞を培養し、そこへ開発した蛍光基質を加え、インキュベート後に蛍光量を測定した。その結果、CV 値が 10% 以下であったため、阻害剤スクリーニング系として適した精度を有するアッセイ系であることを確認した。次に、既知 GII 阻害剤であるカスタノスペルミンやデオキシノジリマイシンを用いて阻害活性を測定した結果、既報の結果と同等の阻害活性が認められたため、本系を用いた阻害剤スクリーニングが可能であると判断した。そこで、化合物ライブラリより GII 阻害剤のスクリーニングを行った結果、十数種類のヒット化合物をえた。ヒット化合物を抗ウイルス薬とするには細胞毒性が低い必要があるため、細胞毒性が報告・予想される化合物は排除し、今後の有機合成手法による構造展開性も考慮に入れ、以下の２つの母核を選出した。今後、より強い GII 阻害活性を持たせるため、構造展開を行う予定である。



小胞体 GII の蛍光基質



GII 阻害剤スクリーニングによるヒット化合物

ER glucosidase II, *N*-linked oligosaccharide, antivirus

発表責任者：袴田航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A20a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A20 会場

非糖ミミックな構造を有するゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤のドラックリポジショニングスクリーニング

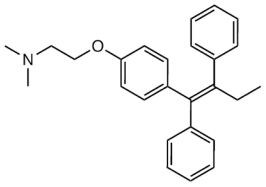
Drug repositioning screen of Golgi mannosidase inhibitor with non-sugar mimic structure.

○小山 亮祐、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸（日本大学大学院生物資源科学研究科）
○Ryosuke KOYAMA, Wataru HAKAMATA, Takako HIRANO, Toshiyuki NISHIO (Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

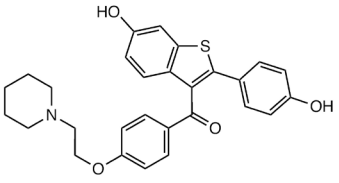
【目的】ゴルジ体マンノシダーゼ (GM) は、真核生物における *N*-結合型糖鎖修飾プロセシング経路の中核を担う重要な酵素である。本酵素が阻害されると、新生タンパク質上の *N*-結合型糖鎖が未成熟なハイマンノース型糖鎖となり細胞表層まで輸送される。この未成熟糖鎖が細胞間のコミュニケーション阻害を引き起こすことにより抗がん活性を発現すると報告されている。しかし、既知 GM 阻害剤は糖ミミックな構造を有するものが多く、糖構造に起因する高い親水性によって、膜透過性の低くなり作用濃度が高くなりがちである。また、不斉中心が多く構造展開が困難であることも要因の１つである。そのため、GM 阻害剤は医薬品に至っていない。

本研究では、本問題の根本的な解決を図るため、糖構造から脱却した非糖ミミックな GM 阻害剤を化合物ライブラリから探索することとした。阻害剤探索には、安全性や薬物動態に対する知見の蓄積がある既知医薬品から GM 阻害剤を探索する、ドラックリポジショニング探索を採用した。これにより、目的とする GM 阻害剤を見出し、迅速な医薬品への応用を目指している。

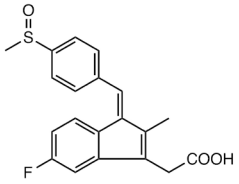
【方法と結果】既知 GM 阻害剤は、添加時に細胞内においてハイマンノース型糖鎖を蓄積することが報告されている。そこで、3 種類の既知阻害剤の細胞添加時におけるハイマンノース型糖鎖の蓄積を蛍光標識 Concanavalin A (ConA) を用いて蛍光顕微鏡により定量を試みた。その結果、既知阻害剤処理は、細胞内にハイマンノース型糖鎖を蓄積し、それに基づく蛍光量および蛍光標識面積が約３倍増加した。そこで、本系による化合物ライブラリからの GM 阻害剤探索を行った結果、エストロゲン受容体のアンタゴニストである Tamoxifen (TAM) と Raloxifene (RAL) および Cox-1・Cox-2 の阻害剤である Sulindac (SUL) の３つの医薬品を GM 阻害剤として得た。TAM と RAL は既知阻害剤の 1/10 の濃度（10 μM）においても、ハイマンノース型糖鎖の蓄積による蛍光量および蛍光標識面積の増加が認められた。SUL は既知阻害剤と同濃度（100 μM）において、ハイマンノース型糖鎖の蓄積による蛍光量および蛍光標識面積が若干増加した。今後は、本医薬品の詳細な GM 阻害機構の解明を試みる予定である。



Tamoxifen
(TAM)



Raloxifene
(RAL)



Sulindac
(SUL)

Golgi mannosidase inhibitor, Drug repositioning screening, non-sugar mimic structure

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A20p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A20 会場

マンゴー由来β1,2-キシロース転移酵素遺伝子の同定・機能解析
Molecular cloning and characterization of novel β1,2-xylosyltransferase from *Mangifera indica* L.
○岡田 貴裕、池田 義孝（佐賀大医）
○Takahiro OKADA, Yoshitaka IKEDA (Saga Univ.)

植物タンパク質に結合した糖鎖の多くは、高等動物には見られない特徴的な糖残基を有している。特に、β1,2-キシロース残基を有するアスパラギン結合型糖鎖はヒトに対して高い免疫原性を示すことが知られており、アレルギー疾患との関連性が指摘されてきた。しかしながら、多くの植物種においてその生合成に関わる責任遺伝子は未同定なままであり、β1,2-キシロース含有糖鎖の発現メカニズムには不明な点が多く残されている。本演題では、代表的な熱帯果樹であるマンゴーよりβ1,2-キシロース転移酵素遺伝子のホモログを新たに同定し、これにコードされるタンパク質の酵素活性を検討した結果について報告する。

アーウィン種マンゴーの果皮組織を用いて cDNA を調製し、候補遺伝子を部分的に増幅した。また、RACE 法により不明な 5’、および 3’末端領域の塩基配列を決定した。これらの結果をもとに RT-PCR を行い、完全長 cDNA を得た。本遺伝子がコードするタンパク質（MiXylT）の糖転移活性は、以下の方法で検討した。

ヨトウガ由来 Sf21 細胞を宿主として MiXylT 安定発現株を作成した。親株、および安定発現株の全タンパク質より得た糖鎖を 2-アミノピリジン（PA）で蛍光標識し、逆相クロマトグラフィー、および順相クロマトグラフィーを用いて二次元的に分画した。さらに、MALDI-TOF MS を用いて蛍光ピークに含まれる PA 標識糖鎖の構造を推定した。その結果、親株と比較して、MiXylT 安定発現株ではキシロース含有糖鎖の発現が顕著に亢進していることが明らかとなった。

以上の結果より、我々が見出した MiXylT 遺伝子は機能的なβ1,2-キシロース転移酵素をコードしており、マンゴー果実においてタンパク質成分のアレルゲン性の原因遺伝子としてはたらく可能性が示唆された。現在、*in vitro* 評価系を用いた酵素活性の検討に取り組んでいる。

本課題は、公益財団法人ニッポンハム食の未来財団「平成 29 年度公募型研究助成事業」の支援により実施した。

Allergen, Protein glycosylation, *Mangifera indica* L.

発表責任者：岡田貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3A20p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A20 会場

ニワトリ CD69 のグルカン結合活性
Glucan-binding activity of chicken CD69
○佐々木 理恵[1]、武藤 愛里[2]、安藤 郷[2]、西脇 多恵子[1]、木落 信郎[2]、伊藤 成美[1]、澤 桃子[1]、奥村 裕紀[1,2]、氏田 稔[1,2] ([1]名城大農、[2]名城大院農)
○Rie SASAKI[1], Airi MUTO[2], Go ANDO[2], Taeko NISHIWAKI[1], Noburo KIOCHI[2], Narumi ITO[1], Momoko SAWA[1], Hiroki OKUMURA[1,2], Minoru UJITA[1,2] ([1]Fac. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

【研究背景・目的】

β-グルカンは D-グルコースが β-グルコシド結合によって連結した多糖であり、キノコ、穀物、海藻などの様々な食品に含まれている。例えば、大麦 β-グルカンは β-1,3-グルコシド結合と β-1,4-グルコシド結合の両方を有し、海藻に含まれているラミナリンは β-1,3-グルコシド結合と β-1,6-グルコシド結合の両方を有するなど、結合様式、分岐、重合度などは多種多様である。このような β-グルカンは免疫賦活作用を示すという報告もあり、β-グルカン受容体の機能解析と合わせて研究が進んでいる。ニワトリにおいても類似の報告があり、β-グルカンを含む飼料をニワトリに与えたところ、免疫力が増強されたという研究結果もある。ヒトやマウスの β-グルカン受容体としては Dectin-1 が知られているが、ニワトリには Dectin-1 は存在しない。しかしながら、ニワトリにおいても β-グルカンによる免疫賦活作用が報告されていることから、Dectin-1 以外の β-グルカン受容体があると考え、研究を行った。ニワトリの CD69（cCD69）がヒト Dectin-1 と相同性を有することから、cCD69 をニワトリにおける β-グルカン受容体の候補分子であると考え、組換え cCD69 を作製し、その β-グルカン結合活性を解析した。

【実験方法・結果・考察】

cCD69 の細胞外領域（首ドメインとレクチン様ドメイン）の N 末端側に FLAG タグと His タグを融合させた組換えタンパク質をカイコ-バキュロウイルス発現系で発現させ、アフィニティー精製を行った（FLAG-His-cCD69）。FLAG-His-cCD69 を不溶性糖鎖ゲルと混合し、インキュベーションおよび遠心分離を行った後、非結合画分として上清を回収した。続いて洗浄および溶出を行い、洗浄画分および結合画分とした。各画分の SDS-PAGE/ウェスタンブロット解析を行い、結合活性を評価した。その結果、FLAG-His-cCD69 は二量体を形成し、特定の β−グルカンと特異的に結合することが明らかになった。これらの結果から、cCD69 は β−グルカン結合能を有し、ニワトリにおいて β-グルカン受容体として機能し、β-グルカンによる免疫賦活作用に関与する可能性が示唆された。

chicken CD69, ß-glucan, baculovirus-silkworm expression system

発表責任者：佐々木理恵（140562024@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：3A20p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A20 会場

超長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ糖脂質類を用いた糖鎖認識抗体の開発

Generation of monoclonal antibodies that recognize mammalian glycoproteins and glycolipids by immunization with glycosphingolipids containing very long chain fatty acids

○奥田 徹哉（産総研生物プロセス）
○Tetsuya OKUDA (BPRI, AIST)

【序論】　糖タンパク質や糖脂質の糖鎖構造の変化は細胞病態を反映することから腫瘍マーカー等の体外診断用医薬品へと応用されており、近年では糖鎖の機能に着目した医薬品開発も進んでいる。我々はこの糖鎖構造をイムノアッセイにて検出するための糖鎖認識モノクローナル抗体の獲得技術について研究を進めており、これまでに超長鎖脂肪酸を含む人工または細胞由来スフィンゴ糖脂質を宿主動物に免疫すると、IgG を含む抗体産生を強く誘導できることを見出している［1]。今回、本技術の応用により糖タンパク質や糖脂質として存在する 6'-Sialyl-LacNAc、Globotetraose をエピトープ認識するモノクローナル抗体をそれぞれ獲得したため、その性質を中心に関連する研究内容を紹介する。
【方法】　6'-Sialyl-LacNAc、Globotetraose それぞれを糖鎖として有し、かつ超長鎖脂肪酸を有するスフィンゴ糖脂質類を化学合成や細胞試料からの分離にて調製し、マウスに免疫して常法によりハイブリドーマを作製した。そのうち標的糖鎖を含む糖タンパク質や糖脂質をエピトープ認識する抗体産生クローンを単離し、産生されるモノクローナル抗体の特異性や親和性を評価した。
【結果と考察】　本方法にて獲得したモノクローナル抗体は ELISA、WB、フローサイトメトリー等の汎用イムノアッセイへの応用が可能であり、糖鎖の微細構造を識別する特異性を有し、抗原の最小検出感度は 10 ng 程度であった。6'-Sialyl-LacNAc を認識するモノクローナル抗体はこの糖鎖構造を有する２種類の血液主要糖タンパク質（Fetuin、AGP）を認識することから、コアタンパク質に関わらず糖鎖そのものをエピトープ認識することが示唆された［2]。Globotetraose を認識するモノクローナル抗体は哺乳動物細胞にて当該糖鎖を有するスフィンゴ糖脂質 Globoside を検出可能であり、ライソゾーム酵素のインヒビター処理により細胞内に蓄積した Globoside の定量的評価に応用可能であった［3]。今回獲得したモノクローナル抗体が認識する糖鎖は糖タンパク質の血中半減期の制御能を有し、一方でライソゾーム病やウイルス/毒素産生細菌感染症の発症に関わることが分子レベルで明らかとなっており、これらの疾患の創薬支援ツールとしての活用が期待される。

Reference
[1] 糖鎖抗原の免疫誘導剤, 特許第 6143240 号
[2] シアリル化糖鎖を認識するモノクローナル抗体, 特許第 6172687 号, US9796785
[3] Okuda, T. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **487**, 76-82

Monoclonal antibody, Glycosphingolipid, Glycoprotein

発表責任者：奥田 徹哉（t-okuda@aist.go.jp）

講演番号：3A20p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A20 会場

プロテオグリカンを改変することによる生体機能への有効性に対する増強効果
Enhancement of effects of salmon nasal cartilage proteoglycan on biological function by its modification

○佐野 栄宏[1]、商 怡[1]、安保 亜衣子[1]、山口 信哉[1]、中根 明夫[2]、齋藤 知明[1]([1]青森産技、[2]弘前大医)
○Masahiro Sano[1], Yi Shang[1], Aiko Anbo[1], Shinya Yamaguchi[1], Akio Nakane[2], Tomoaki Saito[1] ([1]Aomori Itc., [2]Hirosaki Univ.)

[目的] プロテオグリカンは複合糖質の一つであり、細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、様々な機能を担っている。最近の研究から、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンはヒト皮膚線維芽細胞の Erk1/2 を活性化することによって、細胞増殖を促進することが明らかにされている。そこで、プロテオグリカンの生体に対する有効性を高めるために、様々な改変プロテオグリカンを作製し、細胞を用いてその機能性を検証した。
[方法] **(1)** サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンはカルシウムイオンを含んでおり、そのカルシウムイオンを他の金属イオンに置換することで、ナトリウムイオンプロテオグリカン、カリウムイオンプロテオグリカン、マグネシウムイオンプロテオグリカンおよび鉄イオンプロテオグリカンを作製した。また、アクチナーゼによりサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンを処理にすることで、アクチナーゼプロテオグリカンを作製した。**(2)** 各改変プロテオグリカンのヒト皮膚繊維芽細胞の生存率に対する濃度依存的な影響を、プロテオグリカン（５０、１００、２００、４００、８００μg/ml）を添加し、７２時間後に MTT assay により調べた。**(3)** 各種改変プロテオグリカンによるヒト皮膚繊維芽細胞の Erk1/2 活性化に対する影響をウェスタンブロットにより解析した。**(4)** 改変プロテオグリカンの細胞増殖促進効果が Erk1/2 の活性化を介しているかどうかを確かめるために、MEK1/2 阻害剤を用いて改変プロテオグリカンによる細胞増殖が抑制されるかどうかを MTT assay により調べた。
[結果] **(1)** イオン交換プロテオグリカンのカルシウム含有量は、金属イオンに置換される形で減少が見られた。アクチナーゼ処理によりプロテオグリカンの分子量の減少が見られた。**(2)** 鉄イオン型プロテオグリカンは低濃度からヒト皮膚繊維芽細胞の増殖を促進する効果があった。**(3)** 12 及び 24 時間において、鉄イオン型プロテオグリカンは PG と比べてリン酸化 Erk1/2 を有意に増加させた。また、鉄イオン化型プロテオグリカンのみ低濃度から、Erk1/2 の活性化が観察された。**(4)** 鉄イオン化型プロテオグリカンによる細胞増殖促進効果は、MEK1/2 阻害剤により抑制された。
[まとめ] サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンは細胞に対して様々な機能性を持っているが、より高い機能性を持つプロテオグリカンの創出が望まれていた。今回、鉄イオン化型プロテオグリカンには、ヒト皮膚繊維芽細胞に対する強い増殖活性および長時間の Erk1/2 の活性化が観察された。また、その効果は低いプロテオグリカン濃度から観察された。このことから、鉄イオン化型プロテオグリカンは、今までのプロテオグリカンより低用量で皮膚の恒常性維持に貢献する可能性が示された。

Fe-PG, cell proliferation, Erk1/2

発表責任者：佐野栄宏（masahiro_sano@aomori-itc.or.jp）

講演番号：3A20p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A20 会場

Lactobacillus fermentum MTCC 25067 株が生産する高粘性細胞外多糖の物性および構造解析
Rheological and structural characterization of highly viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067

○福田 健二[1]、池田 新矢[2]、村山 大樹[1,2]、鶴巻 茜[1]、佐藤 翔野[1]、浦島 匡[1]([1]帯畜大生命・食料、[2]ウィスコンシン大)
○Kenji FUKUDA[1], Shinya IKEDA[2], Daiki MURAYAMA[1,2], Akane TSURUMAKI[1], Shoya SATO[1], Tadasu URASHIMA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Wisconsin Univ.)

【背景および目的】インド産伝統的発酵乳から単離された *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 株は、高粘性の細胞外多糖（exopolysaccharide、以下 EPS と略す）を生産する。同 EPS はグルコースとガラクトースから構成される中性多糖であるため、静電的相互作用の関与しない高分子鎖の絡み合いを主因として粘性を示すことが予想されているが、詳細は明らかではない。そこで本研究は、動的粘弾性および定常流粘度の解析により同 EPS 水溶液のレオロジー特性を明らかにするとともに、原子間力顕微鏡を用いた分子イメージングにより水溶液中における EPS 分子の形態を推定し、同 EPS 水溶液が粘性を示す分子的基盤についての知見を得ることを目的とする。
【材料および方法】既報に基づき同菌株の培養液 1 L から EPS を約 100 mg 調製した。0.01-2% EPS 溶液の動的粘弾性および定常流粘度は、円錐円板型または共軸二重円筒型の測定部を装着した Discovery Hybrid Rheometer 2（TA Instruments）を用い、80℃から 25℃の範囲で測定した。また、孔径 0.22 μm のシリンジフィルターを用いて 0.1%濃度 EPS 溶液をろ過し、サイズ排除クロマトグラフィーによる分離と多角度光散乱検出器 DAWN EOS（Wyatt Technology）を用いて EPS の絶対分子量を測定した。さらに、マイカ上に 5 ppm の EPS 溶液を 20 μL 滴下し、一晩風乾したのち、原子間力顕微鏡 BioScope Catalyst（Bruker Corporation）を用い、大気中、ピークフォースタッピングモードで分子形態の計測をおこなった。
【結果および考察】2%濃度 EPS 溶液は測定した温度および周波数範囲において常に貯蔵弾性率（G'）が損失弾性率（G''）よりも大きな値を示したが、その差は 2~4 倍程度であった。また、温度変化による高分子鎖の立体構造転移に伴う急激な動的粘弾性の変化は見られなかった。EPS 濃度の低下に伴い G''の寄与が増大し、低周波数において $G''>G'$となる領域が観察されたこと、また、EPS のモル質量は 1.85×10^6 g/mol と見積もられたことから、EPS 溶液は高分子鎖が絡み合うことで強い粘性を示し、高濃度ではゲル様の動的粘弾性を示すことが示唆された。定常流粘度測定から得られたゼロずり粘度の濃度依存性により、EPS 分子の絡み合いがない希薄状態と絡み合いのある準希薄状態の境界を示す臨界濃度は 0.06%と見積もられた。原子間力顕微鏡を用いた観察の結果、水溶液中において EPS 分子は複数の分子が会合した繊維状の会合体として存在することが示唆された。また、EPS 濃度の増加に伴い、これら繊維状会合体がさらに部分的に会合し、少なくとも数 μm 程度の大きさの網目様構造を形成すること、また、これにより強い粘性を示すことが示唆された。

Lactic acid bacteria, Exopolysaccharide, Dynamic viscoelasticity

発表責任者：福田健二（fuku@obihiro.ac.jp）

講演番号：3A21a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A21 会場

Ecobody 法によるウサギモノクローナル抗体取得法の開発

Generation of rabbit monoclonal antibody by Ecobody

○新海 佑介[1]、森下 しおみ[1]、加藤 晃代[2]、兒島 孝明[1]、中野 秀雄[1]([1]名大院　生命農、[2]名城大農)
○Yusuke SHINKAI[1], Shiomi MORISHITA[1], Teruyo KATO[2], Takaaki KOJIMA[1], Hideo NAKANO[1]
([1]Nagoya Univ., [2]Meijo Univ.)

【背景・目的】我々の研究グループでは、動物の末梢血から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントから、無細胞タンパク質合成系を用いて Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する、迅速なモノクローナル抗体取得法 (Ecobody 法) [1,2] を開発し、様々なモノクローナル抗体(mAb)の取得に取り組んでいる。本研究では、従来取得が困難である、膜受容体タンパク質(例として Epidemal Grouth Factor Recepter: EGFR)に対する mAb の取得を目指して、抗体の抗原決定部位のバリエーションが豊富であり、かつ免疫化や採血がマウスに比べ容易なウサギを用いた Ecobody 法を実施した。

【方法と結果】抗膜受容体タンパク抗体の取得では、はじめに EGFR の細胞外ドメインを大腸菌により発現させ、不溶画分からの精製とリフォールディングを行った。これを抗原としてウサギ(New Zealand White Rabbit)に免疫後、その血清を取得し、大腸菌死菌体、およびヒト不死化 B 細胞(HEV0011)とインキュベートし、これらに結合する抗体を除去した血清を得た。得られた血清と HiLyte Fluor で標識した Anti-Rabbit IgG を、ヒト細胞 A431 と HEK293 に塗布して蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞表面に EGFR を大量に提示している A431 の蛍光強度が有意に高かった。このことからこのウサギ血清には、細胞表面の EGFR に結合する抗体が存在していることが示唆された。現在、この血清から Ecobody 法を用いた EGFR に対するウサギ mAb の取得を行っている。

【参考文献】

(1)Ojima-Kato, T., Nagai, S., Nakano, H. (2017) Ecobody technology: rapid monoclonal antibody screening method from single B cells using cell-free protein synthesis for antigen-binding fragment formation. Sci. Rep. 7, 13979.
(2)加藤 晃代、中野 秀雄 (2017) モノクローナル抗体取得技術の新展開 より良い抗体をより早く　化学と生物　55, 490-495.

rabbit, monoclonal antibody, B cell

講演番号：3A21a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A21 会場

Ecobody 法によるヒトシングル B 細胞由来抗インフルエンザモノクローナル抗体の取得と大腸菌による大量発現

Generation of anti-influenza virus monoclonal antibody from human single B cells by the Ecobody technology and mass expression in *E.coli*

○小森 有華[1]、加藤 晃代[2]、兒島 孝明[1]、中野 秀雄[1] ([1]名大院生命農、[2]名城大農)
○Yuka KOMORI[1], Teruyo KATO[2], Takaaki KOJIMA[1], Hideo NAKANO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meijo Univ.)

【目的】

モノクローナル抗体(mAbs)は病気の治療や診断に必須であり、近年その用途はますます拡大している。しかし、ハイブリドーマ法やファージディスプレイ法等の従来法では新規 mAbs の取得に長い時間を要する。一方、我々の研究グループは、動物の末梢血から得られる B 細胞から、一細胞逆転写反応と PCR により抗体遺伝子を増幅し連続的に大腸菌無細胞タンパク質合成系で抗体合成・評価することが可能な高速 mAbs スクリーニング法である Ecobody 法を開発してきた[1)]。そこで本研究ではこの Ecobody 法を用いたヒト B 細胞からの新規 mAbs 取得技術の確立を目的とし、市販のヒト不死化 B 細胞からの抗インフルエンザ抗体の取得を試みた。また、取得した抗体遺伝子の大腸菌を用いた抗体大量発現系を検討した。

【方法・結果】

不死化ヒト B 細胞群から、インフルエンザワクチンに対する mAbs を産生する細胞を選択するため、まず、赤色蛍光色素 HiLyte Fluor 647 で標識した抗ヒト IgG 抗体を用いて IgG 抗体を提示する B 細胞群を染色し、セルソーターにより分取した。次に回収した細胞の中から、インフルエンザワクチンをコートした磁性ビーズに結合する細胞を回収した。得られた細胞は 96 well プレートに 1 cell/well になるように分注した後、ヒト mAbs 遺伝子特異的プライマーによる逆転写反応および 2 段階の PCR を行った。増幅された DNA の配列解析を行ったところ、今回選択された全てのクローンが新規 CDR を含むヒト抗体の遺伝子であることが確認された。さらに、得られた mAbs の遺伝子を鋳型とした大腸菌無細胞タンパク質合成系により抗体フラグメント Fab を合成し、SDS-PAGE と ELISA により、目的サイズの重鎖と軽鎖の発現及びインフルエンザワクチンに対する結合活性をそれぞれ確認した。現在、大腸菌を用いたヒト Fab 抗体大量合成系を構築するために、大腸菌由来プロピルシストランスイソメラーゼである FkpA と Fab との細胞質内共発現や、培養条件の検討を行っている。

1)加藤　中野　化学と生物　55, 490-495、2017

human monoclonal antibody, influenza virus, cell-free protein synthesis

発表責任者：中野秀雄（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A21a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A21 会場

The production and characterization of Fab antibody fused with *Escherichia coli* alkaline phosphatase expressed in *Escherichia coli* oxidative cytoplasm

○ Panwad RITTHISAN[1], Teruyo OJIMA-KATO[1,2], Jasmina DAMNJANOVIC[1], Takaaki KOJIMA[1], Hideo NAKANO[1] ([1]Laboratory of Molecular Biotechnology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Knowledge Hub Aichi, Aichi Science and Technology Foundation)

BACKGROUND

Antibody-enzyme complex have been used for various immunological detections such as Enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA), western blotting, immunochromatography, etc. Enzymes such as peroxidases and phosphatases are generally used to label antibodies via laborious chemical processes. In contrast, genetically-fused antibodies with enzymes would be advantageous over the chemical conjugation, because it requires no such complex reaction processes and the number of enzymes fused with antibodies can be strictly controlled, leading to stable performance of the product. The production of the antibody-enzyme genetically-fused proteins has been almost limited to single-chain Fv-enzyme fusion, owing to its simple structure and easiness of the production in *E.coli* cells. On the other hand, production of active Fab fragments fused with enzymes were considered to be difficult, because its high complexity of structure and folding of the fusion protein. Previously, our group developed a new format of antibody, Fab fused with leucine zippers (LZ) at the C-termini of light and heavy chains named as 'Zipbody' [1)]. The Zipbody has been well expressed both in an *E. coli* oxidative cell-free protein synthesis system and in the oxidative cytoplasm of *E. coli* host cells. In addition, our group also reported that the N-terminal insertion of SKIK peptide to proteins can increase the productivity of the protein in *E.coli* expression systems[2)]. Using these two techniques, here we tried to make a large amount of a bifunctional protein, genetically fused *E.coli* alkaline phosphatase(AP) to Fab and to express it in the *E.coli* oxidative cytoplasmic expression, which makes correct disulfide bridge formation possible.

RESULTS

A mouse Fab binding to *E.coli* 157 (m6Fab) with LZ was genetically fused with AP with or without the SKIK tag, and was expressed in *E.coli* SHuffle T7 Express. The addition of SKIK greatly increased the expression of both the light chain and the heavy chain fragments. The resulting fusion protein (SKIK-m6FabLZ-AP) had both antigen-binding activity and phosphatase activity. The fusion protein was purified to homogeneity by NTA affinity chromatography and size-exclusion chromatography. The yield of the purified fusion protein was 0.21 mg from 1 L batch culture.

REFERENCES

1) Ojima-Kato et al. Protein Eng. Des. Sel. 29, 149-157,2016.
2) Ojima-Kato et al. J. Biosci. Bioeng. 123, 540-546, 2017.

Zipbodyzyme, Leucine zippers, Alkaline phosphatase

発表責任者：Hideo NAKANO（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

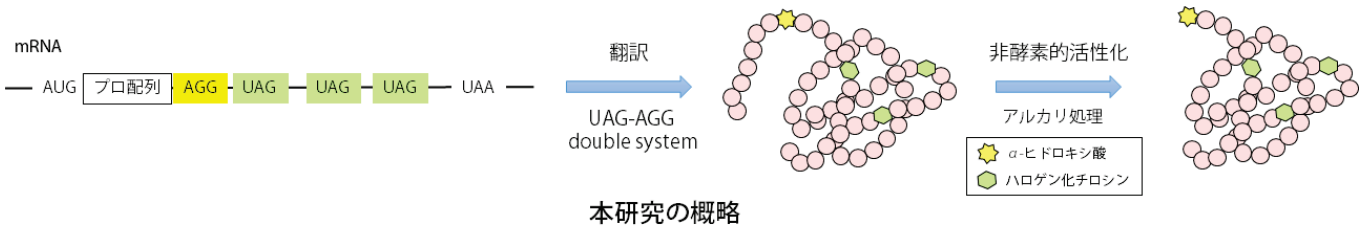
講演番号：3A21a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A21 会場

二種非天然型アミノ酸同時導入による高機能化タンパク質生産

Production of highly functionalized proteins by simultaneous incorporation of two nonnatural amino acids

○大竹 和正[1]、春名 健一[2]、坂本 健作[1] ([1]理化学研究所　ライフサイエンス技術基盤研究センター、[2]味の素株式会社 イノベーション研究所)
○ Kazumasa OHTAKE[1], Ken-ichi HARUNA[2], Kensaku SAKAMOTO[1] ([1]RIKEN CLST, [2]INSTITUTE FOR INNOVATION, AJINOMOTO CO., INC.)

我々はこれまでに大腸菌のゲノムエンジニアリングを通じて翻訳終結因子 1(RF-1)遺伝子破壊株の作製を可能にし、UAG コドンの意味を「翻訳終結」から「非天然型アミノ酸」へと完全に書き換えること(コドン再定義)に成功している[1,2]。RF-1 遺伝子破壊株を用いることにより、従来の細胞を用いたタンパク質生産法では実現困難であった部位特異的多数箇所への非天然型アミノ酸導入が可能となった。実際に多数箇所へのハロゲン化チロシン導入により安定化したタンパク質の生産が可能であることを報告している[3]。さらに、我々は大腸菌における最も使用頻度の低いセンスコドンである AGG アルギニンを、非天然型アミノ酸の一種であるホモアルギニンへと再定義することも可能にしている[4]。これらの知見を融合することにより UAG コドンと AGG コドンを異なる非天然型アミノ酸へと再定義し二種類の非天然型アミノ酸を同時にタンパク質へと導入する手法の開発を進めている。実際にタンパク質架橋酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼに複数のハロゲン化チロシンとα-ヒドロキシ酸を同時に導入し、非酵素的に活性化可能な安定化トランスグルタミナーゼの生産を可能とした例や、その他最新の研究成果について報告する。



本研究の概略

1. Mukai, T. et al., “Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code” *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38 (22), 8188-95
2. Mukai, T. et al., “Highly reproductive *Escherichia coli* cells with a blank assignment for the UAG codon” *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9699
3. Ohtake, K. et al., “Protein stabilization utilizing a redefined codon” *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9762
4. Mukai, T. et al., “Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*” *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43(16), 8111-22

protein engineering, nonnatural amino acid, codon reassignment

講演番号：3A21a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A21 会場

無細胞タンパク質合成系における DNA 結合タンパク質 TALE を用いた遺伝子発現制御

Regulation of gene expression by DNA binding protein TALE on cell-free protein synthesis

○早川 涼人、迫野 昌文（富大院理工）
○Ryoto HAYAKAWA, Masafumi SAKONO (Grad. Univ. Toyama)

〔背景と目的〕ゲノム編集で用いられる DNA 結合型タンパク質 TALE は、対応する DNA のヌクレオチド配列と特異的に結合することが知られている [1)]。本研究は、TALE の DNA 認識特性を利用したタンパク質合成のシグナル応答的制御を目的とする。TALE-DNA 複合体形成にともなう mRNA 転写抑制を行い、その後、TALE の脱離を行うことでタンパク質の発現を任意のタイミングで誘導することを可能にする。

〔実験〕Golden Gate クローニング法および大腸菌異種タンパク質発現系を用いて、DNA 配列 $T(CAT)_5$ を認識する TALE を作製した。DNA 結合能をゲルシフトアッセイおよび ITC により評価した。$T(CAT)_5$ 配列が GFP もしくは T7 プロモーターの上流に配置された 2 種類の GFP 発現 DNA を調製し、それぞれ無細胞タンパク質合成 PUREsystem に導入し、TALE 存在下における GFP の発現を行った。また、TALE の認識配列 $T(CAT)_5$ および非認識配列 $T(CAC)_5$ フラグメント存在下において、同様の実験を行った。さらに、TALE 認識配列を含む PCR 産物添加を用いて同様の GFP 発現誘導をおこなった。

〔結果・考察〕調製した TALE は $T(CAT)_5$ に対して特異的に結合することが ITC とゲルシフトアッセイから示された。TALE 認識配列の挿入位置が異なる 2 種類の GFP 発現 DNA を、無細胞タンパク質合成系に供したところ、TALE 非添加においていずれも GFP を定量的に発現した。一方、TALE 結合配列をプロモーター上流に挿入した DNA において、TALE を添加したところ、GFP 蛍光の低下が確認された。この反応液を PAGE で展開し GFP 抗体で検出したところ、GFP タンパク質の発現量が大きく減少していることが明らかになった。よって、GFP の発現量低下が蛍光低下を招いたと示唆された。一方、TALE 認識配列である $T(CAT)_5$ フラグメント存在下において、同様の実験を行ったところ、TALE を添加していない際の GFP 発現量とほぼ同一の蛍光強度が示された。このとき、TALE 非認識配列である $T(CAC)_5$ 存在下では発現が抑制されたままであった。この結果より、$T(CAT)_5$ の添加により、GFP 発現 DNA と結合していた TALE が脱離したため、GFP の発現が誘導されたと考えられる。また、TALE 認識配列を含むルシフェラーゼ遺伝子を増幅した PCR 産物存在下においても、GFP の蛍光強度の回復が確認された。したがって、TALE-DNA 複合体形成は、タンパク質合成における遺伝子発現制御に有効であることが明らかとなった。

1]Mark C. Politz,; Matthew F. Copeland,; Brian F. Pfleger *Chem. Commun.*, **2013**,*49*, 4325-4327.

TALE, gene expression, cell-free　protein synthesis

発表責任者：迫野昌文（msakono@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3A21a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A21 会場

デザイナーリボソーム構築に向けた試み
Reconstruction of designer ribosomes
○森 めぐみ[1]、宮脇 佑実[1]、油屋 駿介[1,2]、青木 航[1,3]、植田 充美[1,3]([1]京大院・農　応用生命、[2]日本学術振興会(DC1)、[3]京都バイオ計測センター)
○Megumi MORI[1], Yumi MIYAWAKI[1], Syunsuke ABURAYA[1,2], Wataru AOKI[1,3], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science, [3]Kyoto Integrated Science & Technology Bio Analysis Center)

【背景と目的】
リボソームは、設計図となる DNA に従って 20 種類のアミノ酸から多種多様なタンパク質を作りだすことができる。リボソームは細胞の基盤として非常に重要であり、すべての酵素やタンパク質医薬の生産にとっても重大な役割を担う。そのため、リボソームの機能を自由に改変できれば、基礎的にも、応用的にも、大きなインパクトがあるが、リボソーム関連遺伝子への変異導入はその多くが致死的であり、未だ実現されていない。そこで、本研究ではリボソーム生合成プロセスを *in vitro* で再構成することを目指した。リボソーム生合成プロセスの *in vitro* 再構成により、任意の変異を保持するリボソームの構築が可能になり、優れた機能を持つリボソームに改変した、いわゆる「デザイナーリボソーム」の創出に向けた基盤技術となると期待される。

【方法と結果】
我々はモデルとして、比較的多くの知見が蓄積している大腸菌のリボソーム生合成プロセスに注目した。まず大腸菌の破砕液を作製し、その中に rRNA と 54 種類のリボソーマルタンパク質をコードする遺伝子を導入した。rRNA には抗生物質耐性を与える変異を導入しており、新しく構成されるリボソームと初めから大腸菌破砕液に含まれているリボソームとを区別可能にしている。次に、トリプル四重極型質量分析機を用いることで、リボソーム生合成プロセスをモニタリングし、その過程を詳細に解析中である。本学会では、これらの結果をまとめて報告する[1]。

[1] M. Mori et al, submitted

Ribosome, Ribosome biogenesis, in vitro Reconstruction

講演番号：3A21a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A21 会場

タンパク質進化を潜在的に支配する安定性
Protein stability potentially governed the evolution
○倉橋 亮[1]、田中 俊一[2]、佐野 智[1]、松村 浩由[3]、高野 和文[1] ([1]京府大院生命環境、[2]立命大 R-GIRO、[3]立命大生科)
○Ryo KURAHASHI[1], Shunichi TANAKA[2], Satoshi SANO[1], Hiroyoshi MATSUMURA[3], Kazufumi TAKANO[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Ritsumeikan Univ. G-GIRO, [3]Ritsumeikan Univ.)

【目的】
進化は生命特有の性質であるがゆえに、その研究は生命現象を理解する上で大変重要である。しかし、生命の起源や進化過程に関する問題は未だに解明されていない。進化の原因は主に DNA の突然変異であり、その DNA 変化はタンパク質配列に直接的に影響を及ぼす。変異によってタンパク質は機能向上や新たな機能を付与されるが、その変異のほとんどがタンパク質を不安定化させる。これまでの研究により、安定性は進化にとって重要な因子であるということが分かってきたが、進化過程における詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、好熱性 Archaea タンパク質である *Sulfolobus tokodaii* 由来エステラーゼ（Sto-Est）を用いた進化実験を行う。エステラーゼ遺伝子にランダムに変異を導入し、ランダム変異体ライブラリを作製する。ここで、活性に加えて、新たな指標として安定性に着目し、安定性の異なる変異体を進化させながら、活性変動を観測することにより、進化と安定性の関係を直接的に検証した。本実験では、ライブラリ内で親タンパク質（テンプレート）よりも活性が増加した変異体の割合を進化率（%）で表した。さらに、高活性酵素取得のために安定性を選択圧とした新たなスクリーニング法の確立も試みた。
【結果・考察】
第一世代のライブラリでは、20%の変異体タンパク質が野生型（WT）タンパク質よりも活性が高かった（Evolvability; 20%）。異なる安定性をもつ変異体にそれぞれランダム変異体を導入し、世代を追っていくと、進化過程において、各世代の進化率はテンプレートの安定性に依存していた。これは、タンパク質進化はその安定性によって潜在的に支配されているということを意味している。さらに、活性が低下した変異体は安定性を維持することによって、その後の進化で回復することができた。この結果から、進化のためのタンパク質の配列空間は、ほぼ中立進化の間に拡張することができるということを示唆している。分子進化は地球上での生命誕生以来続いている重要な現象であり、それに基づいたメカニズムはシンプルである。それゆえ、これは我々の簡便な実験系によって証明された。これらの知見をタンパク質工学へ応用するため、新たなスクリーニング法の確立を試みた。従来のスクリーニング法に新たな指標として安定性を加えることで、今回の基礎的な研究によってみられた低活性変異体の活性回復の現象や配列空間探索の過程を数世代にわたって観察することが可能となる。この方法が確立すれば、高機能タンパク質の効率的な獲得が期待される。

esterase, directed evolution, protein stability

講演番号：3A21a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A21 会場

大腸菌を宿主とした可溶性発現におけるα-ヘリックス構造の親水性・疎水性領域の重要性

Importance of hydrophilic/hydrophobic region of α-helix in soluble expression using *Escherichia coli*

○篠田 優[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO)
○Suguru SHINODA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】大腸菌を宿主とした組換えタンパク質の生産は、安価で生産性が高いことから広く用いられている。しかし、発現したタンパク質が封入体を形成し、不溶化・不活化されることが大きな問題点の一つである。当プロジェクトでは、変異導入による可溶性発現について検討し、一次構造情報から不溶性発現に関与すると予測されるアミノ酸残基 (ホットスポット) を抽出するための 2 つの方法、「α-helix rule」と「Hydropathy contradiction rule」を提案し、それぞれの有用性を示してきた[1]。α-helix rule は、α-ヘリックス構造上に存在する親水性または疎水性領域と各アミノ酸残基の疎水性度に着目し、領域の性質と相反するアミノ酸をホットスポットとして抽出する方法である。そこで本研究では、逆にタンパク質表面に位置し、親水性面と疎水性面が明確に判別できる α-ヘリックス構造を選択し、「不溶性発現」のホットスポットを抽出できるかどうかについて検討した。
【方法・結果】本研究では、立体構造が解明されている *Escherichia blattae* 由来酸性ホスファターゼをモデルとして用いた。本酵素は α-ヘリックス構造を 13 ヶ所有しており、大腸菌で可溶性に発現する。その中で最も保存され、可溶性発現に最も寄与していると考えられるアミノ酸残基を別の 19 種類のアミノ酸に置換し、発現に対する規則性を検討した。まず、α-ヘリックス構造が 7 つ以上のアミノ酸残基で構成され、ヘリカルホイール図で明確に親水性面と疎水性面が判別できる 2 つの α-ヘリックス構造部分を選択した。次に、選択した α-ヘリックス構造部分の中で保存性が高いアミノ酸残基を調べ、各 α-ヘリックス構造の疎水性領域に存在するアラニン (Ala) とロイシン (Leu) を選抜した。選択した Ala と Leu を置換した変異体を大腸菌で発現させ、酵素活性測定とウェスタンブロッティングで発現を解析した。その結果、選択した部分の Ala と Leu を疎水性領域を崩すような親水性アミノ酸に置換すると、不溶化する傾向が見られた。特に Leu を親水性アミノ酸に置換した場合は、発現量が著しく低下した。この結果は、Leu が存在するペプチドの周辺が Ala の周辺と比較してより疎水的な環境であるため、Leu の親水性アミノ酸残基への置換が、より強く発現量の低下に影響したと考えられた。これらの結果から、α-ヘリックス構造に存在するアミノ酸残基の疎水性度並びにその周辺環境は、大腸菌を宿主とする可溶性発現に重要であり、この手法により「不溶性発現」のデザインも可能であることを示した。
【参考文献】
1) D. Matsui and S. Nakano, et al., *Sci. Rep.*, **7**, 9558-9569 (2017).

α-helix, hydropathy, acid phosphatase

講演番号：3A21a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A21 会場

メタンモノオキシゲナーゼホモログ発現に関連する GroEL 様タンパク質の単離と特性評価

Preparation and characterization of GroEL-like proteins involved in the expression of methane monooxygenase homologs

○井上 千裕、安部 欣高、藤枝 伸宇（阪府大・生命環境）
○Chihiro INOUE, Yoshitaka ABE, Nobutaka FUJIEDA (Osaka Prefecture Univ.)

【背景・目的】 メタンやエタン、プロパンなどの低級アルカンを含む天然ガスは重要な資源であるものの常温で気体であることから、保存や輸送には液化過程を経る必要があるため、石油・石炭に比べてエネルギー的に不利である。しかしながら、これらのアルカンをアルコールに直接変換することができれば、液体燃料として保存が可能な上、化学原料としての利用が可能になる。本研究では天然ガスを液体燃料へと変換する手段として、C_1～C_4 の低級アルカンを温和な条件でアルコールに変換する酵素である可溶性メタンモノオキシゲナーゼに着目した。しかし、この酵素を保持するメタン資化性菌は増殖が遅いので、大量生産するためには、増殖の速い大腸菌などでの異種発現が必要である。また、それをコードする遺伝子を含むオペロン上に GroEL 様タンパク質のホモログをコードする遺伝子が存在することがわかっているが、その機能を始め、構造などの分子論的な性質はまだはっきりとわかっていない。そこで本研究では、メタンモノオキシゲナーゼホモログの大量調整を目指し、GroEL 様タンパク質の単離、及び生化学的解析を行うことを目的とする。

【方法・結果】 ゲノムデータベースから得られた 12 種類の GroEL 様タンパク質をコードする DNA を挿入したプラスミドを合成し、大腸菌に導入して発現させた。次に遠心分離で上清と沈殿に分け、SDS-PAGE で確認した。25℃で IPTG 誘導をかけたところ、12 種類のうちの 2 種類の GroEL 様タンパク質が大腸菌において可溶性発現した。これらの遺伝子上にヒスチジンタグを付与し、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、600 kDa 以上の分子量を持つことが明らかとなった。

soluble methane monooxyganese, chaperone, GroEL

発表責任者：井上千裕（c.inoue@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A21a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A21 会場

可溶性メタンモノオキシゲナーゼホモログの異種発現系の構築

Heterologous expression of soluble methane monooxygenase homologs

○安部 欣高、井上 千裕、藤枝 伸宇（阪府大・生命環境）
○Yoshitaka ABE, Chihiro INOUE, Nobutaka FUJIEDA (Osaka Prefecture Univ.)

[背景]
天然ガスの主成分であるメタン、エタン、プロパン等の低級アルカンはガス状分子であり貯蔵、運搬に多大なコストがかかる上、これらの低級アルカンは反応性に乏しい。しかし、これらの低級アルカンを水酸化し、アルコールにすることで液体となり体積が減少することに加え、化学原料としての汎用性が増し、有用な物質合成に用いることが可能となる。低級アルカンを水酸化する酵素の一つとして可溶性メタンモノオキシゲナーゼが古くから注目されている。しかしながら、それらを保有するメタン資化性菌は増殖が非常に悪いことから、これらの生物種から酵素を直接精製することや細胞のまま利用するのは効率が悪い。そこで本研究では、可溶性メタンモノオキシゲナーゼのホモログタンパク質群を大腸菌内で共発現させ、活性のある異種発現系を得ることを目的とした。
[方法]
可溶性メタンモノオキシゲナーゼ α サブユニットのアミノ酸配列を用いて相同性検索を行った結果、好熱菌を含んだ幾つかの微生物に類似タンパク質をコードする遺伝子が見つかった。これらのメタンモノオキシゲナーゼホモログを含むオペロンには 8 種の一群タンパク質をコードする DNA が存在した。これら全ての遺伝子を大腸菌に対するレアコドンを減らし、最適化を行った状態で合成した。プラスミドに DNA を導入後、大腸菌に形質転換し、発現させたタンパク質を SDS-PAGE で分析した。また、メタンモノオキシゲナーゼホモログ群を共発現させたサンプルを 50 mM グルコースを含む 50 mM リン酸カリウム buffer 中でフェノール、プロパンと反応させ、活性を確認した。
[結果]
SDS-PAGE の結果から、大腸菌内で α サブユニットと GroEL ホモログタンパク質を共発現させることで、α サブユニットの可溶化が確認できた。このことから GroEL ホモログタンパク質は大腸菌内でシャペロンとして働き、メタンモノオキシゲナーゼホモログ α サブユニットの折り畳みを補助することが示唆された。またフェノール、プロパンと反応させたところ、大腸菌内で α サブユニットと GroEL ホモログタンパク質を共発現させたサンプルではこれらの基質に対して水酸化活性があることが確認できた。

soluble methane monooxygenase, chaperone, alkane hydroxylation

発表責任者：安部　欣高（y.abe@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A21a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A21 会場

Ruminiclostridium josui 由来のアラビノフラノシダーゼとアセチルキシランエステラーゼの両触媒ドメインを持つ新規な酵素 Abf62A-Axe6A の酵素特性およびヘミセルラーゼ複合体の活性

Characterization of a novel bifunctional arabinofuranosidase/acetyl xylan esterase from *Ruminiclostridium josui*, Abf62A-Axe6A, and Abf62A-Axe6A-containing xylanolytic complex

○汪 亜運、粟冠 真紀子、國武 絵美、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
○Yayun WANG, Makiko SAKKA, Emi KUNITAKE, Tetsuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【背景と目的】*Ruminiclostridium josui* (*Clostridium josui*) は、中温性のセルロース分解性嫌気性細菌であり、セルラーゼ複合体（セルロソーム）を形成する。*R. josui* の持つセルロソームに関するタンパク質にはセルラーゼやキシラナーゼだけではなく、ヘミセルロース鎖の側鎖を切断･ 遊離する酵素も含まれる。本研究では、ヘミセルロース鎖の側鎖を切断･ 遊離するアラビノフラノシダーゼとアセチルキシランエステラーゼの活性を持つと予想される酵素と本菌由来のキシラナーゼとの複合体を形成することによる活性への影響を調べることを目的とした。*R. josui* のゲノム中に、アラビノフラノシダーゼとエステラーゼの両触媒ドメインを持つ新規な遺伝子 *baeA* を見出した。Abf62A-Axe6A は CAZy の分類によるアラビノフラノシダーゼファミリーGH62 の触媒ドメイン、ファミリー6 の CBM、糖質エステラーゼファミリーCE6 の触媒ドメイン及びドックリンを持つ酵素である。
【方法と結果】Abf62A-Axe6A のシグナルペプチドを除いた領域（RjAbfAxe）、GH62 と CBM6 を含む領域（RjAbf-CBM6）及び CE6 のみの領域（RjCE6）をそれぞれ大腸菌で発現させ、各酵素の性質を調べた。さらに、本菌由来のキシラナーゼと RjCipA も大腸菌で発現させ、それぞれの酵素の組合せによる相乗効果及び各酵素と RjCipA の複合体を形成することによる活性への影響を調べた。RjAbf62A-Axe6A の至適温度と至適 pH をライ麦アラビノキシランを基質として測定したところ、それぞれ 55℃と pH 5.5 であった。また、RjAbfCBM6 の至適温度と至適 pH はそれぞれ 50℃と pH 6 であった。RjAbfAxe と RjAbf-CBM6 は小麦アラビノキシランと甜菜アラビナンなどの多糖からの分解産物を TLC で分析したところ、アラビノースが検出されたことから GH62 はアラビノキシラン及び分岐アラビランの側鎖のアラビノースを遊離する α-L-アラビノフラノシダーゼであると判断された。RjAbfAxe と RjAbf-CBM6 によるライ麦アラビノキシランに対して最も高い比活性を示し、小麦アラビノキシラン、甜菜アラビナン及びオート麦キシランに対しても強い活性を示した。不溶性小麦アラビノキシラン、リニアアラビナン及び稲わら粉末に対する分解活性も検出された。RjAbfAxe と RjAbf-CBM6 はアラビノオリゴ糖とキシロオリゴ糖に対しても活性を持つことから、RjAbfAxe と RjAbn-CBM6 はアラビノオリゴ糖の α-1,5 結合やキシロオリゴ糖の β-1,4 結合には作用できることが示された。幾つのアラビノキシロオリゴ糖を基質として反応を行った結果、O-2 または O-3 の位置に 1 つだけアラビノースを結合しているもの及び O-2 と O-3 の両方にアラビノースを結合しているもの全てを切断することが示された。一方、RjAbfAxe と RjCE6 は不溶性小麦アラビノキシランなどからアセチル基を遊離するアセチルキシランエステラーゼ活性を示した。さらに、各酵素の組合せによる相乗効果および各酵素と RjCipA の複合体を形成することによる活性への影響を調べた。

arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase, xylanolytic complex

発表責任者：Yayun Wang（wyyngdmie@gmail.com）

講演番号：3A21a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A21 会場

芳香族アミノ基酸化酵素の位置選択性改変系の構築

Development of an evolutionary system for modifying regioselectivity of an aromatic amine *N*-oxygenase

○冨田 宏矢[1,2]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]JST, CREST)
○Hiroya TOMITA[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]JST, CREST)

【背景・目的】 現代の化学工業や有機合成化学における物質変換は化学的変換プロセスに大きく依存しており、穏和な条件で立体選択的・位置選択的な変換が可能な酵素反応の介入が求められている。しかしながら目的の活性を持つ酵素が知られているケースは稀有である。そこで、酵素を目的の活性を持つように人工的に進化させる指向性進化 (directed evolution) が注目を浴びている。

本研究は芳香族ニトロ基を生産する酵素に関して指向性進化を適用し、その機能の改変を目的としている。研究対象である AurF は、放線菌 *Streptomyces thioletus* が生産するポリケタイド性抗生物質 aureothin の生合成において、*p*-aminobenzoic acid (PABA) の *p*-アミノ基を酸化的にニトロ基に変換し、*p*-nitrobenzoic acid (PNBA) を生産する酵素である [1)]。また他の芳香族化合物の *p*-アミノ基も酸化できる [2)]。一方、これまで *m*-アミノ基を酸化する酵素は知られておらず、*m*-ニトロ基を持つ天然物も発見例がない。*m*-ニトロ基を合成する酵素の取得は酵素学的な価値のみならず、酵素反応を利用した物質変換を工業へと応用していく上で、また化合物ライブラリーの構造多様性を拡張する上で、大きな意義がある。そこで、我々は AurF の位置選択性を改変し、芳香族化合物の *m*-アミノ基を *m*-ニトロ基に変換する酵素の創生を目指している。

【結果・考察】 ニトロ化酵素の指向性進化を実施する上で、生成したニトロ化合物を検出するためにはニトロ基が菌体内で十分に安定である必要がある。そこで大腸菌 BL21(DE3)株の休止菌体に *m*-ニトロ化合物 (4-hydroxy-3-nitrobenzoic acid) を加え、その変換の有無を調べた。その結果、ニトロ基が還元を受けた化合物およびその *N*-アセチル化体の蓄積が見られ、BL21(DE3)株は宿主として適切ではないことが判明した。この変換にはニトロ還元酵素が関わることが予想されたため、大腸菌において広範なニトロ化合物を還元する NfsA, NfsB の遺伝子破壊株を作製したが、この株もまたニトロ基を還元した。そこで、多種の遺伝子が破壊されたミニマムゲノム (MGF) 株 [3)]を用いて同様の実験を行ったところニトロ基が還元されなかったため、MGF 株を宿主株に採用した。なお、MGF 株では大腸菌の遺伝子発現に多用される pET システムが機能しないので、アラビノースにより転写が活性化される *araBAD* プロモーターを使用した発現系を構築した。*aurF* 発現 MGF 株を用い、本来の基質である PABA を加えて休止菌体反応を行ったところ、PNBA の生成と蓄積を確認することができた。現在、ニトロ化酵素をハイスループットにスクリーニングするための基盤構築を進めている。

[1)]He *et al.*, ***JACS*** (2004), [2)] Chanco *et al.*, ***Bioorg. Med. Chem.*** (2014), [3)] Mizoguchi *et al.*, ***DNA Res.*** (2008)

protein engineering, directed evolution, Streptomyces

講演番号：3A21a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A21 会場

Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by combining various mutations

○Misato BABA[1], Ryota KAKUE[1], Christoph LEUCHT[2], Peter RASOR[2], Heiko WALCH[2], Daniel LADIGES[2], Christian BELL[2], Kenji KOJIMA[1], Teisuke TAKITA[1], Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Roche Diagnostics GmbH)

[Purpose] Reverse transcriptase (RT) is the enzyme important for viral genome replication and possesses RNA- and DNA-dependent DNA polymerase and RNase H activities. We previously generated a highly thermostable triple variant of Moloney murine leukemia virus RT, MM3 (E286R/E302K/L435R), by introducing positive charges by site-directed mutagenesis at positions that have been implicated in the interaction with template-primer[1)]. In this study, we tried further increasing the thermostability of MM3.

[Method] Twenty-nine mutations were newly designed, focusing on increase of surface charge, stabilization of hydrophobic core, introduction of salt bridge, and avoidance of disulfide bridge (Table 1). The corresponding 29 single variants and 15 multiple variants were produced in *Escherichia coli*. Thermostability of each variant was assessed by the residual activity after 10-min thermal incubation.

Table 1. Mutations designed and characterized

(i) Increase of surface charge	(ii) Stabilization of hydrophobic core	(iii) Introduction of salt bridge
V43E	A32V	L41D
L72R	A42V	Q63E
M177R	V118I	L272E
I179R	Y146F	W336R
I212R	A154I	I347E
L234R	I261F	L357D
M289R	C310L	V370E
L351E	D361L	W388R
L368R		
L410R	(iv) Avoidance of disulfide bridge	
	C90S	
	C262S	
	C409R	

[Results and Discussion] Six mutations (A32V, L41D, L72R, I212R, L272E, and W388R) were selected as the candidates for further stabilizing MM3. Fifteen multiple variants were constructed by introducing one, two, or more of the six mutations into MM3. When cDNA synthesis reaction was conducted with MM3.14 (A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R) at 55, 60, or 65ºC for 10 min, the fluorescence increased in the subsequent real-time PCR. On the other hand, when the reaction was conducted with WT or MM3, the fluorescence did not increase, indicating that MM3.14 exhibited higher thermostability than MM3. MM3.14 might be more valuable for various research including transcriptome analysis and clinical diagnosis than wild-type [2)].

[References] 1. K. Yasukawa et al. *J. Biotechnol.* **150**, 299−306 (2010)
2. M. Baba et al. *Protein Eng. Des. Sel.* **30**, 551−557 (2017)

reverse transcriptase, thermostability, Moloney murine leukemia virus

講演番号：3A21a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A21 会場

放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの活性三残基、アスパラギン酸の変異体はアルコリシス活性を亢進する

Mutation of Aspartic acid on catalytic triad enhances alcoholysis of *Streptomyces* feruloyl esterase

○裏地 美杉、東海 彰太、畑中 唯史（岡山生物研）
○Misugi URAJI, Syota TOKAI, Tadashi HATANAKA (RIBS, Okayama)

［目的］
フェルラ酸は、イネ科植物細胞壁に豊富に含まれる桂皮酸類のひとつで、強い抗酸化活性を持つとともに、様々な疾患に対して抑制効果が示されている。その一方で、フェルラ酸は難水溶性のため、食品や化粧品などの一部の産業に限定的に使用されており、更なる用途の拡大には水溶性の向上が必要である。フェルラ酸エステラーゼ（FAE）は、桂皮酸エステル体に対して、加水分解反応と、アルコールなどを付加するアルコリシス反応を示すが、通常は加水分解反応が優位におこる。本研究では、アルコリシス反応を利用した水溶性フェルラ酸エステル体作出に資する FAE の研究開発を目的とし、放線菌 FAE のアルコリシス反応を解析した。
［方法と結果］
放線菌 FAE、R18 の構造解析により、エステラーゼの構造に保持される活性三残基セリン、アスパラギン酸、ヒスチジンは想定されていたが、実際にこれら三残基の変異体 S191A、S191C、D214A、H268A では、加水分解活性とともにアルコリシス活性も失っていた。セリン型プロテアーゼには、活性中心のセリンをシステインに変更することで、ペプチド分解活性より、ペプチド結合活性が亢進するという報告（Abrahmsen *et al.*, 1991 Biochemistry, 30:4151-9）があったが、エステラーゼの活性中心セリンをシステインに換えた変異体では、そのような活性を検出することができなかった。また、野生型 FAE の R18 では、アルコリシス活性よりも加水分解活性が優位であったが、D214 の変異体のうち、D214N 変異体は、わずかな加水分解活性とアルコリシス活性を示し、加水分解活性よりもアルコリシス活性が優位であった。
D214N 変異体は加水分解活性、アルコリシス活性ともに至適 pH が 10 であり、野生型 R18 の至適 pH 7 と比べると酵素特性の変化が見られた。さらに、pH10 での加水分解活性は R18 より低かったが、pH10 でのアルコリシス活性は R18 のおよそ 4 倍であった。また、D214E、D214Q 変異体においても、D214Q で同様にアルコリシス活性/加水分解活性の比率の向上が認められた。これらの結果から、活性三残基のアスパラギン酸のカルボキシル基がアミド基に置き換わることにより、酵素特性が変化し、アルコリシス活性亢進に寄与していると考えられた。

feruloyl esterase, alcoholysis, *Streptomyces*

発表責任者：裏地美杉（uraji@bio-ribs.com）

講演番号：3A21a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A21 会場

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼによるアミノ酸のアセチル化反応におけるキラル認識
Acetylation of amino acids using acetylcholinesterase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 with stereoselective function

○井上 尚[1]、吉田 知博[2]、佐伯 將[2]、美藤 友博[2]、清水 克彦[3]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農、[3]鳥取大産学)
○Hisashi INOUE[1], Tomohiro YOSHIDA[2], Sho SAIKI[2], Tomohiro BITO[2], Katsuhiko SHIMIZU[3], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]Org. Reg. Ind. Acad. Coop., Tottori Univ.)

【目的】アセチルコリンエステラーゼ（AChE）は Ser 残基を活性中心に持ち、アセチルコリンをコリンと酢酸に加水分解する反応を触媒する。我々はこれまでに、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株から AChE 活性を有する酵素（Pa-AChE）を見出し、異種発現系の構築とその利用に向けた検討を行ってきた。その中で本酵素は加水分解の副反応として、アミノ基や水酸基のアセチル化反応も触媒することが明らかとなった。Pa-AChE によるアセチル化反応では、アセチルコリンに代わり酢酸エチルをアセチル基の供与体として利用することが可能であり、これまでに低分子のアルキルアミンやアミノアルコール（炭素数 4～10）を認識してアセチル化反応を触媒することが証明された。本研究では、アセチル化が可能なアミノ酸類の探索を目的として、Pa-AChE によるアミノ酸のアセチル化反応を試みると共に、その光学異性の認識について評価した。
【方法】Pa-AChE を使用したアミノ酸のアセチル化反応は、酢酸エチルもしくはアセチルコリン（終濃度 0.5M）をアセチル供与体として使用し、pH 6.0（Tris-マレイン酸緩衝液)、TritonX-100 の存在下で行った。生成物は TLC もしくは LC/MS を用いて解析した。
【結果】L-アミノ酸と L-アミノ酸-メチルエステル（-OMe）を対象とし、酢酸エチルをアセチル供与体としてアセチル化反応を行うと、L-Lys-OMe と L-Arg-OMe において、アセチル化されたアミノ酸誘導体が確認された。一方で、L-Lys と L-Arg においては、アセチル化反応がほとんど確認されなかったことから、アセチル受容体の大きさだけではなく構造や物性も Pa-AChE は識別していることが考えられた。続いて Pa-AChE の立体認識について評価するため、D-Lys-OMe と D-Arg-OMe を使用して同様の検討を行った。その結果、それぞれの基質に対するアセチル化反応は確認されず、Pa－AChE によるアセチル化反応では、アミノ酸の光学異性も認識していることが明らかとなった。しかし、アセチルコリンをアセチル供与体として用いると、すべてのアミノ酸とその誘導体でアセチル化反応が行われず、Pa-AChE のアセチル化反応では、化合物ごとに最適なアセチル基の供与体が存在することも示唆された。現在は酢酸エチルをアセチル基の供与体とした場合におけるアミノ酸のアセチル化最適条件の検討や、アセチル化反応のメカニズムの解明に向けた研究を行っている。

acetylation reaction, stereoselectivity, amino acid methyl ester

発表責任者：有馬二朗（arima@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3A21p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A21 会場

大腸菌ゲノムに遺伝子導入された人工的な代謝酵素複合体によるクルクミンの生産

Production of curcumin by artifical metabolon genetically integrated into Escherichia coli genome

○吉越 健輔[1]、石澤 崇昭[1]、篠田 優[1]、平野 勝紹[1]、鮒 信学[2]、春木 満[1]、平野 展考[1] ([1]日大・工、[2]静岡県立大・栄養・食品生命科学)

○Kensuke Yoshikoshi[1], Takaaki Kokuzawa[1], Suguru Shinoda[1], Katsuaki Hirano[1], Nobutaka Funa[2], Mitsuru Haruki[1], Nobutaka Hirano[1] ([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Biol. & Appl. Chem, [2]Univ. of Shizuoka, Dept. of Food & Nutritional Sci.)

天然のポリケタイド化合物には、ウコンのクルクミンや、ブドウのレスベラトロールなど、抗腫瘍作用や抗酸化作用等の様々な生理活性を持つものが数多く存在する。近年、有用生理活性を持つこれらの誘導体を微生物や酵素によって生合成する手法が注目されている。本研究では、長鎖 DNA が導入可能な放線菌ファージ TG1 由来部位特異的組換え酵素（インテグラーゼ）を用いて、大腸菌ゲノムの特定部位へ導入した生合成遺伝子オペロンからの、効率的な物質生産を目標とした研究を行った。

一般に、ゲノムへ生合成酵素遺伝子を導入した場合、プラスミドへ導入した場合と比較して、酵素発現量が大きく低下し、生合成量も低下する。これまでに、TG1 インテグラーゼを用いたポリケタイド化合物（赤色色素フラビオリン）の生合成酵素遺伝子のゲノム遺伝子導入から、植物バイオマス分解酵素複合体（セルロソーム）の骨格タンパク質―酵素間相互作用を用いて生合成酵素を複合体化することで、少量の酵素発現量であっても、プラスミドに遺伝子導入した場合と同等まで、生合成量が回復する結果を得ている。

今回、他のポリケタイド化合物の微生物生産への汎用性を検討するため、同様の手法でクルクミン生合成酵素の複合体化を行い、複合体遺伝子を大腸菌ゲノムへ導入した際の生合成量を検討したので報告する。

artificial metabolon, polyketide, serine-type integrase

発表責任者：吉越　健輔（ykensuke@chem.ce.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A21p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A21 会場

ラン藻由来アシル ACP 還元酵素の変異解析による炭化水素合成量の向上

Improvement of hydrocarbon productivity of cyanobacterial acyl-ACP reductase by protein engineering

○工藤 恒、林 勇樹、新井 宗仁（東大・総合文化・生命）
○Hisashi Kudo, Yuuki Hayashi, Munehito Arai (Dept. Life Sci., Univ. Tokyo)

近年、藻類を利用したバイオ燃料生産が注目されている。藻類であるラン藻は主に炭素数 15, 17（C15, C17）の軽油に相当する炭化水素を合成するが、この反応はアシル ACP 還元酵素（AAR）とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ（ADO）という 2 つの酵素によって触媒される。AAR はアシル ACP（C_n）をアルデヒド（C_n）に還元し、ADO はアルデヒドを炭化水素（C_{n-1}）に変換する。また AAR, ADO を大腸菌内で共発現させると炭化水素を合成できるようになることから、AAR, ADO は炭化水素合成に必須である。しかし AAR, ADO の活性は非常に低いため、藻類によるバイオ燃料生産に応用するには、AAR, ADO の高活性化が重要である。また、特に AAR については立体構造が未知であり、機能発現に重要なアミノ酸部位などについても未解明な部分が多い。さらにどのラン藻に由来する AAR が高い活性を持つのかについても未解明であった。そこで我々は以前、様々なラン藻に由来する AAR と *Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 ADO（73102 ADO）を大腸菌内で共発現させることで、炭化水素合成量、酵素発現量、活性、基質特異性を比較した。その結果、炭化水素合成量及び活性がともに高かったのは、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR（7942 AAR）であった（Kudo *et al.* (2016) *Biotechnology for Biofuels*, 9: 234）。さらに 7942 AAR と 73102 ADO をラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入したところ、野生型に比べて炭化水素合成量を 2 倍増加させることに成功した。

そこで本研究では、炭化水素合成量をさらに増大させるために、AAR の高活性化に寄与しうるアミノ酸部位を探索することとした。先の様々なラン藻由来 AAR の比較より、7942 AAR と *Synechococcus* sp. PCC 7336 由来 AAR（7336 AAR）の間では炭化水素合成量、酵素発現量、活性、基質特異性の全てが大きく異なっていた。そこで、7336 AAR（低活性型、C16 アルデヒドを多く合成）のアミノ酸配列を 7942 AAR（高活性型、C18 アルデヒドを多く合成）のアミノ酸配列に近づけるように、非保存部位 40 箇所における 1 アミノ酸置換変異解析を行った。その結果、7336 AAR の可溶性発現量と活性をそれぞれ向上させうるアミノ酸部位の同定に成功した。今後、これらの部位において様々な変異を導入することにより、様々な AAR の発現量と活性を向上できると期待される。また、これらの変異を同時に導入した 7336 AAR の多重変異体を作製したところ、野生型の基質特異性を維持したまま、C16 アルデヒドの合成量を著しく増加させた 7336 AAR 変異体の創出に成功した。この変異体を用いれば C15 のアルカンを多く合成できるようになる。したがって本研究の成果は、炭素数の異なるバイオ燃料を作り分ける上でも有用と期待される。

Acyl-(acyl carrier protein) reductase, Cyanobacteria, Hydrocarbon

発表責任者：新井宗仁（arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A21p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A21 会場

進化分子工学によるフィチン酸加水分解酵素の低温活性向上

Directed evolution of phytic acid-degrading enzyme for improved low-temperature activity

○和田 愛未、林 勇樹、新井 宗仁（東大・総合文化・生命環境）
○Manami WADA, Yuuki HAYASHI, Munehito ARAI (Dept. Life Sci., Univ. Tokyo)

植物の効率的な生育には、リン肥料の存在は欠かせない。しかし、リン肥料の原料であるリン鉱石は 300 年前後で枯渇することが予想されている。リン肥料に含まれるリンは土壌に投与されると 20%程度しか植物に届かないだけでなく、土壌中で拡散・吸着してしまい、回収することは困難である。持続的な食料生産を続けていくためには、リン肥料の効率的使用と使用量の削減が必要である。

そこで本研究では、土壌中に蓄積されるリン化合物に注目した。有機態リンは土壌中の全リンの最大 80%を占める。有機態リンの中で最も一般的な化合物がフィチン酸である。フィチン酸やフィチン酸塩は土壌によっては有機態リンの 80%を構成する。大腸菌由来フィターゼ AppA は、フィチン酸から無機リン（PO_4^{3-}）を遊離させる酵素の中でも、最も高い活性を有するものの 1 つである。しかし、AppA のフィチン酸加水分解活性は、日本の平均的な土壌温度 15℃において最大活性の 20%を下回る。土壌中において効率よくフィチン酸から無機リンを得るためには、土壌温度で AppA を高活性化する必要がある。ゆえに本研究では、土壌温度 15℃における AppA の高活性化を目的とした。

AppA 高活性化に向け、まず AppA 発現系と進化分子工学を用いたスクリーニング系の構築を行った。*appA* 遺伝子は大腸菌 BL21（DE3）株から取得し、BL21（DE3）株と BL21（DE3）pLysS 株に組み込んだ。活性測定と SDS-PAGE の結果から、BL21（DE3）pLysS 株における活性の方が優れていたため、発現株として以後用いた。AppA 変異体は、ランダムに変異を加えた *appA* 遺伝子を組み込んだプラスミドで大腸菌を形質転換することで作製し、多数のコロニーを得た。AppA 変異体のスクリーニングでは、始めにろ紙上で多数のコロニー内に含まれる AppA 変異体の酵素反応を 15℃で行い、生成物を発色反応により検出し、野生株より著しく活性の低下した（発色の弱い）変異体を除外した。次に選抜した変異体を液体培養し、菌体破砕上清を用いた定量的な活性測定により、高活性化した変異体を選抜した。さらに、スクリーニング条件の最適化を行った。まず、ろ紙上での AppA 酵素反応時間を延長することで発色強度を改善した。また、菌体破砕方法はリゾチームによる破砕を採用し、本培養時間は 10 時間に決定した。今後、最適化した条件で AppA 変異体のスクリーニングを行い、高活性化 AppA を取得し、特徴付けを行っていく。本研究から得られる高活性化 AppA 変異体は、農作物などの植物が土壌中から効率よくリンを獲得し、生育するのに役立つことが期待される。

directed evolution, hydrolase, phosphate compounds

発表責任者：新井 宗仁（arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A21p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A21 会場

Arthrobacter sp.KI72 におけるナイロンモノマー代謝に関する遺伝子クローニングと代謝経路の同定

Metabolic pathway of nylon-monomer in *Arthrobacter* sp. KI72

○藤井 翼[1]、竹原 一起[1]、橋本 悠[1]、加藤 太一郎[2]、武尾 正弘[1]、根来 誠司[1] ([1]兵庫県大・院工・応化、[2]鹿児島大・理)

○Tsubasa FUJII[1], Ikki TAKEHARA[1], Yu HASHIMOTO[1], Daiichiro KATO[2], Masahiro TAKEO[1], Seiji NEGORO[1] ([1]Hyogo Univ., [2]Kagoshima Univ.)

【目的】*Arthrobacter* sp. KI72 はナイロンオリゴマー(6-アミノヘキサン酸環状/直鎖状オリゴマーの総称)を単一炭素源/窒素源として生育する。本微生物が保持する 3 種類の酵素(NylA/NylB/NylC)により、同オリゴマーは 6-アミノヘキサン酸（Ahx）まで分解されるが、これより下流の代謝経路は解明されていない。モノマー以降の代謝系は、不要ナイロンからの有用物質への変換や、バイオマスからのナイロン原料の生産への応用が期待できる。本研究では Ahx の代謝経路の同定を目的として検討を行った。

【方法】4-アミノ酪酸(GABA)代謝経路との類似性から、Ahx はアミノトランスフェラーゼ(NylD)によりアジピン酸セミアルデヒドに変換され、その後、デヒドロゲナーゼ(NylE)によりアジピン酸へと変換されると予測した。NylD 活性は、Ahx をアミノ基供与体とし、α ケトグルタル酸、ピルビン酸、または、グリオキシル酸をアミノ基受容体として酵素反応を行い、生成物を TLC で検出した。NylE 活性は、化学合成したアジピン酸セミアルデヒドを基質とし、$NADP^+$を補講素として、340nm の吸光度の増加速度から確認した。

【結果】*Arthrobacter* sp. KI72 の全ゲノム配列（ドラフト配列）を決定後、NylD は 4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼの配列を、NylE は $NADP^+$依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼの配列をクエリとして、相同遺伝子を探索した。その結果、KI72 株のドラフトゲノム配列から、*nylD* については 2 種、*nylE* については 20 種の相同遺伝子が認められた。類縁酵素との系統関係から、$nylD_1$ および $nylE_1$ 遺伝子の機能確認に焦点を絞り、同遺伝子を PCR で増幅し、コールドショック発現ベクター(pCold I)に組み込み、大腸菌で His-tag 融合タンパク質として精製した。反応産物を TLC で検出したところ、$NylD_1$ について、ピルビン酸からアラニン、グリオキシル酸からグリシンへの変換活性が検出され、同遺伝子産物が 6-アミノヘキサン酸アミノトランスフェラーゼであると同定した。一方、$NylE_1$ の His-tag 酵素について、アジピン酸セミアルデヒドからアジピン酸への変換活性が確認できた。以上の結果から、Ahx は、まず $NylD_1$ によりアジピン酸セミアルデヒドへ、次いで $NylE_1$ によりアジピン酸へ変換されると結論した。さらに、NylD に対して NylE 過剰の条件下で、NADPH の生成速度からアミノトランスフェラーゼ活性を定量的に測定可能な実験系を構築した。$NylD_1$ と $NylE_1$ を共役させた反応系において、生成した NADPH とアミノ酸の量から、90%以上の収率で、Ahx はアジピン酸へ変換されると推定した。

Arthrobacter sp.KI72, aminotransferase, dehydrogenase

講演番号：3A21p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A21 会場

エチレングリコール中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能相関
Correlation between Strucyure and Function of the Nylon hydrolase in Ethlene glycol
○岡崎 秀明、生越 大輔、戸田 光、麦田 悠紀、竹原 一起、武尾 正弘、根来 誠司（兵庫県立大学大学院）
○Hideaki OKAZAKI, DAISUKE OGOSHI, HIKARU TODA, YUKI MUGITA, IKKI TAKEHARA, MASAHIRO TAKEO, SEIJI NEGORO (Grad.Sch.Eng.,Univ.Hyogo)

【目的】ナイロンが生物作用を殆ど受けない要因として、ⅰ）ナイロンユニットを認識できる酵素が生物界に殆ど存在しないこと、ⅱ）ポリマー鎖同士が強固な水素結合で結合しているため、一部のアミド結合が切断されても、会合体からのオリゴマーの離脱が進まないことが挙げられる。ナイロン分解の効率化として、ⅰ）分解酵素の高機能化、ⅱ）モノマー化が容易なポリマーの探索、ⅲ）ポリマーを溶解する有機溶媒・イオン液体中での反応などのアプローチが考えられる。特に、有機溶媒中での酵素反応は、化学処理と酵素処理の連携を容易にする。NylB については、有機溶媒中（10%含水）でアミド合成活性が高い変異体と、加水分解反応のみを示す変異体を取得している（J. Mol.Cat.B.Enzymatic,64,81-88,2010）。本研究では、ナイロンのリサイクル処理で、エチレングリコール（EG）が用いられていることに着目し、EG 中、および、EG/水混合系でのナイロン分解酵素（NylC）の二次構造、安定性、及び、活性との関連性について検討した。

【方法及び結果】親型 NylC に $G^{122}Y^{130}A^{36}Q^{263}$ 置換が導入された変異酵素(GYAQ 変異体と略す)（T m ＝ 88℃）（J.Biol.Chem.287, 5079-5090, 2012）を用いた。EG (0～99%、10%間隔)と水との混合液に、基質（6-アミノヘキサン酸環状オリゴマー）を終濃度 4mg/ml、GYAQ 変異体を 1mg/ml になるように加え、60℃で 60 分酵素反応を行った。経時的に反応溶液の上清 60μl をサンプリングし、遊離アミノ基の定量から分解性を評価した。また、EG 中のタンパク質の二次構造変化を円二色性（CD）から、凝集性を動的光散乱（DLS）から測定した。GYAQ 変異体において、80%以上の EG 濃度に溶解させた酵素の CD スペクトルは、活性型酵素（水溶液中）とスペクトルの形状は類似していたが、約 10nm 長波長域へシフトしていた。しかし、熱変性タンパク質の CD スペクトルとは異なっていたことから、EG中でも立体構造は維持されていると推定した。CD スペクトルで得られた結果を、Beta Structure Selection (BeStSel)構造予測プログラム（Proc.Natl.Acad.Sci.USA,112, E3095,2015）に入力し、二次構造を推定した。EG 濃度が高くなるにつれて、α-herix の割合が増加するという傾向が見られた。50%EG中で、95℃まで加熱後、25℃に戻した状態で CD 測定を行ったところ、加熱を行わなかった場合に近いスペクトルが得られたことから、EG 中で構造がリフォールディングする可能性が示唆された。各 EG 濃度、および、リフォールディング前後の酵素活性と構造との関連性についても報告する。

nylon oligomer

講演番号：3A21p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A21 会場

プトレッシンオキシダーゼと発色試薬を用いたプトレッシンの新規簡易定量法の開発

Development of a novel method for quantification of putrescine using putrescine oxidase and chromogenic reagents

○太田 宏一、杉山 友太、栗原 新（石川県大生資環）
○Hirokazu OHTA, Yuta SUGIYAMA, Shin KURIHARA (Ishikawa Prefectural Univ.)

《背景・目的》ポリアミンは、１分子中にアミノ基を二つ以上含む脂肪族化合物であり、ほぼすべての生物に見出される生理活性アミンである。近年、ポリアミンを摂取することで、オートファジーの誘導、ヒストンのアセチル化の促進、血管および腸管における炎症抑制が起こり、これらの作用を通じて、動物の認知力が向上することや寿命が伸長することが報告されている。細菌はポリアミンを自ら生産し、特定の生育条件でこれを放出するが、尿路感染症菌 *Proteus mirabilis* は、細胞外に放出したポリアミンを細菌細胞間におけるコミュニケーションツールとして用いることが報告されている（Sturgill et al., Mol Microbiol, 2004, 51: 437-46）。現在、ポリアミン定量に主に用いられている HPLC は操作が煩雑な上に費用・時間を必要とする。そこで本研究では、ポリアミンの一つであるプトレッシンに注目し、その糞便中および培養上清中の濃度を簡便に測定することを目指して、プトレッシンオキシダーゼと発色試薬を組み合わせた比色定量法の開発を行った。
《方法・結果》培養上清および糞便抽出液中のプトレッシン濃度を比色定量する目的で、精製した *Rhodococcus erythropolis* 由来プトレッシンオキシダーゼとワサビ由来ペルオキシダーゼ、発色試薬である TOPS と 4-アミノアンチピリン（4-AA）を組み合わせ、以下に示すプトレッシン濃度依存的に起こる吸光度上昇を測定する簡易定量系の開発と条件検討を行った。

$$\text{プトレッシン} + O_2 + H_2O \rightarrow H_2O_2 + NH_3 + \text{4-アミノブタナール}$$

$$H_2O_2 + \text{TOPS} + \text{4-AA} \rightarrow \text{TOPS-4-AA} + H_2O + 1/2O_2 \quad (\text{TOPS-4-AA を } A_{550} \text{ で比色定量})$$

本簡易法を用いて培養上清中及び糞便抽出液中のプトレッシン濃度を定量したところ、HPLC による定量値と同様の傾向の値を得ることができた。本簡易法に対する基質特異性を調べたところ、プトレッシンに対する反応速度を 100%とした時にカダベリンには 11.1%、スペルミジンには 2.2%、アグマチンには 2.1%反応することが分かった。また、複数の食品からポリアミンを抽出し、本簡易法を用いてプトレッシン濃度を定量したところ、ピーマンと牛肉については HPLC による定量値と同様の傾向の値を得ることができたが、しめじ、納豆については HPLC による定量値と乖離する値が得られた。これらの結果から、本簡易法は培養上清や糞便抽出液、複数の食品抽出液中のプトレッシン濃度を定量することができ、HPLC に代わる簡便な定量法であることが示された。

Putrescine, enzymatic quantification method, food

講演番号：3A21p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A21 会場

1-オクタノール／緩衝液二相系におけるチロシナーゼを用いたテアフラビン-3-ガレートの効率的合成

Efficient synthesis of theaflavin-3-O-gallate by tyrosinase-catalyzed reaction in 1-octanol/buffer biphasic system.

○奈良井 朝子、中山 勉（日獣大・応生科）
○Asako NARAI, Tsutomu NAKAYAMA (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【背景・目的】　紅茶に含まれる赤橙色色素のテアフラビン（TF）類は、茶葉由来のポリフェノール酸化酵素によるカテキン酸化と酸化物どうしの非酵素的な 2 分子縮合を介して生成するベンゾトロポロン骨格をもつ化合物である。縮合するカテキンの組み合わせは、B 環がカテコール型の(-)-エピカテキンまたはそのガレート（EC, ECg）と B 環がピロガロール型の(-)-エピガロカテキンまたはそのガレート(EGC, EGCg)であり、4 種類の TF（TF1, TF2A, TF2B, TF3）が存在する。これまで TF 類には様々な生理活性が報告されており、更なる研究や応用に向けた安定供給を目的として TF 合成過程の解析や茶葉以外の酵素を用いた TF 類の合成が試みられている。しかし、一般的に TF 類の収率・収量は低い。演者らは今回、カテキン類の分配係数に着目し、マッシュルーム由来チロシナーゼを用いた 1-オクタノール／緩衝液二相系反応において TF2A を効率的に合成できることを見出した。
【方法】　TF2A 合成基質である EC と EGCg をリン酸緩衝液 pH 6.0 に単独あるいは混合して溶解後、等量の 1-オクタノールを加えた。次にチロシナーゼを添加後、撹拌して反応を開始した。一定時間反応後に遠心分離をおこない、オクタノール(O)画分と緩衝液（B）画分をそれぞれ採取し、RP-HPLC に供してカテキン類と TF2A の濃度変化を分析した。キノン生成物は *o*-phenylenediamine と反応させ phenazine 誘導体に変えて RP-HPLC で分析した。
【結果】　EC は O, B 両画分に同程度分配され、EGCg は主に O 画分に分配された。それぞれ単独でチロシナーゼと反応させた時の減少速度は EC＞EGCg であった。EC と EGCg を混合した条件ではカテキン類の減少速度は EC＜EGCg となり、生成した TF2A が O 画分に蓄積した。1-オクタノールを添加しない緩衝液系に比べて TF2A の収量は増加し、O 画分の基質消費量に対する収率も著しく上昇した。1-オクタノール中ではチロシナーゼによるカテキンの酸化が観察されなかったことから、二相系の場合、B 画分で酵素による EC の酸化が起こり、O, B 両画分の境界面で EC キノンと EGCg の共役レドックス反応ならびにキノンどうしの 2 分子縮合を介した TF2A 生成が進行すると考えられた。また、phenazine 誘導体分析の結果、緩衝液系では TF2A 合成よりも優位に起こる EGCg 自身の二量体形成が、二相系の O 画分では顕著に抑えられることが分かった。

（本研究の一部は、内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」、JSPS 科研費 JP17K07823 の助成を受けて実施した。）

tyrosinase, theaflavin, enzymatic synthesis

発表責任者：奈良井朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：3A21p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A21 会場

Burkholderia 属細菌 Para-1 株由来アセチルコリンエステラーゼの Cys 残基置換の影響 -有機リン系農薬検出系への応用を目指して-
Effects of cysteine residue replacements on acetylcholinesterase from *Burkholderia* sp. Para-1 - Application for organophosphorus pesticides analyzer -
○藤本 拓也[1]、北村 智彬[1]、泊 直宏[2]、山本 佳宏[2]、鶴岡 直樹[3]、茂里 康[3]、渡部 邦彦[1]([1]京府大院生命環境、[2]京産技研、[3]産総研)
○Takuya FUJIMOTO[1], Chiaki KITAMURA[1], Naohiro TOMARI[2], Yoshihiro YAMAMOTO[2], Naoki TSURUOKA[3], Yasushi SHIGERI[3], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Pref. Univ. Grad., [2]KITC, [3]AIST)

【背景・目的】アセチルコリンエステラーゼ (AChE)はメタミドホスやマラチオンなどの有機リン系農薬により強力に阻害されるため、AChE 阻害を指標とした農薬検出システムへの応用が期待される。本研究室では、動物由来以上に安価で機能改変が容易な微生物由来 AChE に着目し、簡便な農薬検出系の開発を試みている。これまでに AChE 産生菌の *Burkholderia* 属細菌 Para-1 株を単離し、Para-1 株由来 AChE (PaAChE)の大腸菌大量発現系で得られる組換え体 AChE (rAChE)を用いた農薬検出系の開発が行われている。しかし、rAChE は不安定な酵素なため失活と阻害による活性低下を混同してしまう可能性があった。さらに、低温でも保存しておくと徐々に失活してしまい、活性が一定な rAChE の供給が難しい。rAChE は Cys 残基を 10 個も含んでおり、不安定性の要因につながる可能性が高いため、本研究ではこれら Cys 残基に着目し、他の残基に変異させることで rAChE の安定化および失活原因の解明を目指した。

【方法・結果】電気泳動的に均一に精製した rAChE を、4℃または 37℃において高タンパク質濃度 (1 mg/ml)で保存し、経時的に活性測定と(非)還元 SDS-PAGE を行った。4℃の非還元 SDS-PAGE ではダイマーやトリマーなどの多量体が観察され、37℃ではモノマーバンドが減少し、それに伴い活性も減少した。還元 SDS-PAGE では上記のような変化は見られなかったため、失活は Cys 残基による酸化凝集であることが示唆された。次にソフトウエア SWISS MODEL による PaAChE の立体モデル構造の構築と他の生物由来 AChE とのマルチプルアライメントを行い、Cys 残基の特徴付けを行った。Cys76, Cys96 は動物由来 AChE において高度に保存されており、分子内ジスルフィド結合の形成が示唆された。残る 8 個の Cys 残基は、相同酵素でも保存性が低いため、不安定化の要因として疑われた。構築した立体モデル構造から、Cys 残基の多くは溶媒露出度が高く、酸素による酸化的凝集を引き起こすと考えられた。そこで、相同性が有意に認められる動物由来 AChE や *Geobacillus stearothermophilus* 由来カルボキシルエステラーゼの構造と比較しながら、site-directed-mutagenesis により Cys 残基の置換を行った。発現が確認できた変異体酵素(Cys19→Leu, Cys69→Ala, Cys470→Thr)について、野生型 rAChE(WT)と酵素機能および安定性を比較した。その結果、活性や発現量に影響はなく、4℃, 1.0 mg/ml 保存において酸化凝集が改善された。しかし、37℃では WT と同様の挙動を示したため、残存する Cys 残基が不安定化に関与している可能性が考えられた。現在は、さらなる Cys 残基欠損変異体酵素の作製と安定性への影響を調査しながら、ion-sensitive field-effect transistor (ISFET)を用いた農薬濃度分析への応用も試みている。

acetylcholinesterase, cysteine, site-directed-mutagenesis

講演番号：3A22a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A22 会場

鉄酸化細菌を利用したジルコニウム含有ベンガラの作製

Production of zirconium-containing bengala pigment by using an iron oxidizing bacterium

○田村 勝徳[1,2]、中西 真[1]、久能 樹[1,2]、久能 均[1,2]、高田 潤[1,2] ([1]岡大院自科、[2]CREST)
○Katsunori Tamura[1,2], Makoto Nakanishi[1], Tatsuki Kunoh[1,2], Hitoshi Kunoh[1,2], Jun Takada[1,2] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., [2]CREST)

【目的】
我々はこれまで，自然界で地下水が湧き出る溝や水溜りに見られる褐色沈殿物は，鉄酸化細菌が作り出すユニークな鞘状酸化鉄(以後，BIOX と称す)の集合体であることを明らかにし，その特徴解明と機能開拓の研究を行ってきた[1, 2]. BIOX は人工合成が困難な直径約 1 μm の多孔質アモルファス構造体で，主構成元素比は Fe:Si:P=73:22:5 である. また，BIOX は多重高機能（赤色顔料，Li イオン二次電池負極材など）であることを見出している. しかし，天然の BIOX における構成元素の種類と比はその産地が異なってもほぼ一定であるため，機能の制御や更なる向上が困難である. そこで我々は，以前単離した鞘形成鉄細菌株 OUMS1[3]の人工培養系を改良し，有機質鞘の形成過程と無機元素の沈着過程からなる2段階法によって、新たに Zr を含有した BIOX 鞘の作製を行った. また，得られた試料の加熱処理後の色調を検討した.
【方法】
第 1 段階として，OUMS1 株を鉄を含まない培地中で 20℃，3 日間振盪培養し，細菌の分泌有機物からなる鞘を得た. 次に第 2 段階として，この有機物鞘を酢酸緩衝液中で $ZrCl_4$ 及び鉄粉と混合し，20℃で 3 日間震盪した. 得られた Zr 含有酸化鉄試料を水洗及び凍結乾燥し，SEM，EDX，XRD などで評価した. また，一部の試料を 500～1100℃で空気中加熱し，色調を分光測色計で調べた.
【結果及び考察】
本研究で用いた2段階作製法によって，天然の BIOX に含まれない Zr を最大 40%まで含有した BIOX 鞘を作製した. 第 2 段階における $ZrCl_4$ の処理濃度を調節することによって，BIOX 産物中の Zr 含有量を人為的に制御することが可能であった. Zr を 40%含有する BIOX を 800～900°C で加熱したところ，従来の市販ベンガラと比較して顕著に高彩度な赤色を呈した. また，この Zr 含有 BIOX は，1000°C の高温加熱及び 800°C の再加熱に対して色調の熱耐性を示した. 高含有の Zr は，加熱処理による α-Fe_2O_3 の粒子成長を抑制することによって，色調の熱耐性に寄与していると推察された. 今後，高 Zr 含有 BIOX は，生物素材由来の高級赤色顔料として工業的利用が期待される.
【参考文献】
[1] Hashimoto *et al.* (2007) J. Magn. Magn. Mater. 310, 2405-2407. [2] 高田 潤ら (2016) 粉体および粉末冶金. 63, 869-875. [3] Sawayama *et al.* (2012) Microbiology 63, 173-180.

biogenous iron oxide, bengala, zirconium

講演番号：3A22a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A22 会場

DNA アプタマーを整列固定化するバイオナノカプセル足場分子の開発

Development of bio-nanocapsule-based scaffold for oriented immobilization of DNA aptamer

○山田 裕紀、飯嶋 益巳、黒田 俊一 (大阪大学)
○Yuuki YAMADA, Masumi IIJIMA, Shun'ichi KURODA (Osaka Univ.)

【目的】バイオセンサーの検出感度やダイナミックレンジを最大限に高めるには、センサー表面の検出用分子（IgG、受容体、DNA アプタマー、糖鎖等）をクラスター化し精密整列化して固定する必要がある [1]。これまでに我々は、センサー表面で IgG の Fc 領域を固定して Fv 領域を放射状に提示する足場ナノ粒子「Protein A 由来 Fc 結合 Z ドメイン提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC)」を用いて、IgG 及び Fc 融合受容体のクラスター化と精密整列化に成功し、抗原及びリガンドの高感度検出を達成した [2,3]。しかしながら、本 ZZ-BNC は Fc 領域を有する検出用分子に限定されていたので、幅広い検出用分子への応用ができなかった。本研究では BNC 表層に特異的 DNA 配列結合領域（single-chain Cro（scCro）[4]）を提示して「scCro-BNC」とし、DNA アプタマーのクラスター化と精密整列化を達成するか検討した。
【方法】出芽酵母内で scCro-BNC を発現させ、同菌体をガラスビーズで破砕し、透析後、熱処理（60℃、20 分）を行った。次に硫酸化セルロファイン及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて scCro-BNC を精製した。透過型電子顕微鏡（TEM）および動的光散乱法（DLS）を用いて形状と粒子径をそれぞれ測定した。さらに、水晶発振子微量天秤法（QCM）のセンサー表面に、トロンビン特異的 DNA アプタマーを直接（直接法）または scCro-BNC を介して間接（scCro-BNC 法）で固定し、トロンビンの検出感度及び結合能を測定した。
【結果】精製 scCro-BNC は、TEM 及び DLS の解析により直径 50-100nm のナノ粒子であることが判明した。次に、QCM において scCro-BNC 法は、予備実験結果ながら直接法と比べて単位面積当たりのトロンビン結合量が約 1.7 倍上昇していた。これは、DNA アプタマー1 分子に結合するトロンビン分子が約 2.5 倍増加したことを示しており、scCro-BNC 表層において DNA アプタマーがクラスター化及び精密整列化されたことを強く示唆していた。以上から、scCro-BNC は DNA アプタマーを用いるバイオセンサーの高感度化及び標的タンパク質結合能を高める有望な足場ナノ粒子であり、「BNC 足場ナノ粒子技術」は高い汎用性を有すると考えられた。今後は様々な DNA アプタマーを用いて各種バイオセンサーにおける scCro-BNC 法の至適条件を精査する予定である。
[1]Iijima, M. et al. Biosens. Bioelectron. 89, 810-821 (2017). [2] Iijima, M. et al. Biomaterials 32, 1455-1464 (2011). [3] Iijima, M. et al. Biotechnol. J. 11, 805-813 (2016). [4] Jana, R. et al. Biochem. 37, 6446-6455 (1998).

Bio-nanocapusule, DNA aptamer, oriented immobilization

発表責任者：黒田　俊一（skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A22a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A22 会場

金ナノ粒子ー磁性ナノ粒子クラスターを用いたノロウイルスの分離・濃縮による高感度検出

Ultrasensitive detection of Norovirus by separation and concentration using gold-magneto nanoparticle cluster

○竹村 謙信[1]、リー ジャエウォーク[2]、オルワセサン アデゴケ[2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化、[2]静大・グリーン科技研)
○Kenshin Takemura[1], Jaewook Lee[2], Adegoke Oluwasesan[2], Enoch.Y Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Coll. Agric., Grad. Sch. Interg. Sci., & Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. & Technol., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】毎年ノロウイルスによる感染者が続出し、社会的脅威である。主な感染経路はヒトからヒトへの接触感染であり、感染すると発熱、嘔吐、下痢及び腹痛等の症状が現れる。極めてまれにではあるがけいれんを伴う小児例や脳症などのケースも報告され、高齢者や幼児に感染した場合、重症化の可能性がある。現在治療や予防薬として直接効果のある薬剤はない状況である。高齢化社会が進んでいる現代社会では、このような感染症による感染の拡大を防ぐために、高感度かつ迅速な検出法が求められている。本研究では、ノロウイルスの特異的抗体を修飾した金平糖型金ナノ粒子ー磁性ナノ粒子複合体（AuNP-MNP）を合成し、簡便にノロウイルスを分離することで、更なる高感度検出を目指した。
【方法】蛍光性半導体 CdSe/InS core/shell quantum dot (QD)は、当研究室で作製したものを用いた。AuNP/MNP は室温条件下での鉄イオンの還元により作製した磁性ナノ粒子溶液に金イオン及び還元剤を加え一定時間の金イオン還元を行うことで磁性ナノ粒子上に均一な大きさ・形状の金平糖型金ナノ粒子を形成する 2 段階合成法により作製した。QD と AuNP-MNP にノロウイルスの特異的抗体を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)-N-hydroxy-sulfo-succinimide sodium salt (NHS)を用いた EDC/NHS カップリングによって修飾を行い、抗体修飾粒子を遠心分離により精製した。抗体修飾 QD と抗体修飾 AuNP-MNP を混合して検出液にし、ノロウイルス様粒子を加え、１０分間室温でインキュベーションした後に強磁性の磁石により AuNP-MNP を分離、洗浄した。洗浄した粒子を超純水中に分散させ、蛍光強度を測定した（励起光 400 nm、蛍光 648 nm）。
【結果】QD は 648 nm の蛍光波長を有し、非常に高い蛍光特性を示した。量子効率は 97%であり、蛍光物質として扱うのに適した値であった。また、作製した AuNP-MNP は 560 nm 吸光波長を有し、金ナノ粒子としての光学特徴を有した。作製した AuNP は、金平糖型であり、AuNP は磁性ナノ粒子上に配置されたナノ粒子複合体を形成していることが透過型電子顕微鏡（TEM）の検鏡により明らかになった。ナノ粒子複合体は強磁性の磁石により容易に分離できた。ノロウイルス様粒子の検出ではウイルス濃度が０～1 pg/ml の範囲で高精度での検出が可能であった。このことからヒト血清やヒト糞便中など多くの夾雑物を含む溶液中のノロウイルスも、夾雑物の影響を受け難い高感度検出が可能であると考えられる。

immunofluorescence, AuNP-MNP, Zika virus

発表責任者：竹村　謙信（takemura.kenshin.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A22a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A22 会場

ミミズ *Eisenia fetida* で構築した遺伝子導入法の応用可能性の検討及びミミズによるバイオ医薬品生産の試み

Investigation to determine the effectiveness of *Eisenia fetida* gene injection system against other earthworms, and biomedicine production using the earthworms

○山谷 竜大、竹内 綾、町田 悠、土田 喜野、赤澤 真一（長岡高専物質工）
○Tatsuhiro YAMAYA, Aya TAKEUCHI, Yu MACHIDA, Kino TSUCHIDA, Shin-ichi AKAZAWA (Dept. Material Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll.)

【目的】近年，遺伝子組換え生物を用いて治療薬を生産するバイオ医薬が注目されており，特に動植物個体そのものを用いた生産法は高額な生産設備を必要としないため次世代型生産法として注目されている[1]．そこで我々は，新規宿主としてシマミミズ *Eisenia fetida* に着目し，異種遺伝子発現系の構築を目指してきた．これまでの研究で，我々はマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することにより，切断した *E. fetida* 尾部への遺伝子導入に成功し，遺伝子導入に最適な培地及びエレクトロポレーション条件等を明らかにしてきた[2]. 本研究では構築した遺伝子導入法が近縁種であり，入手も容易なミミズ *Eisenia andrei* に適用可能か検証した．*E. andrei* も *E. fetida* 同様に経済協力開発機構（OECD）が土壌毒性試験のモデル生物として認定しているため，本技術の適用によりモデル生物としての有用性がさらに向上する事が期待される．また，動物細胞により生産されている腎性貧血のバイオ医薬品であるヒトエリスロポエチンを生産する遺伝子を *E. fetida* 尾部へ導入し，ミミズにおけるバイオ医薬品生産を試みた．
【方法】切断した *E. andrei* 尾部を 0.6%寒天培地で 24 h 培養した後，組織再生面にルシフェラーゼ遺伝子を導入した．遺伝子導入の確認は，ルシフェラーゼの発光強度を計測することにより行った．次に *E. fetida* 尾部に hEPO 遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子と同様の方法で導入した．遺伝子導入を行った *E. fetida* 尾部断片からゲノムを抽出し，hEPO 遺伝子の確認を PCR 法で検証した．
【結果】*E. andrei* へ遺伝子導入した結果，生存率 75%，形質転換効率 10%と *E. fetida* の効率と比較し，やや低い結果となったが，*E. fetida* で構築した遺伝子導入法は *E. andrei* へ適応可能であることが明らかとなった．また，hEPO 遺伝子がゲノムに組み込まれているか，PCR により確認したところ，目的断片の増幅が確認され，さらに断片をシークエンス解析した結果，遺伝子導入を行った hEPO 遺伝子と配列が一致した．これによりミミズゲノム中に hEPO 遺伝子が組み込まれていることが明らかとなった．hEPO が実際に生産されているかは現在検討中であるが，バイオ医薬品生産実現に一歩近づいた．本研究は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究（15K14713），基盤研究 C（17K07767）の助成を受けて実施された．
[1]赤澤真一．バイオ医薬品とその生産宿主．Medical Science Digest．42 (10)，pp. 5-8，2016.
[2]山谷竜大他．第 69 回日本生物工学会大会．2017 年 9 月．要旨集 3P-E022.

Earthworm, Transformation, Biomedicine

発表責任者：赤澤真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：3A22a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A22 会場

生物のセキュリティーホールを攻撃する人工遺伝子

An artificial gene attacking a security hole of organism

○小林 英城 (海洋機構)
○Hideki KOBAYASHI (JAMSTEC)

【緒言】ゲノム上の遺伝情報は、mRNA に転写後、tRNA を介して蛋白質として翻訳される。この「翻訳」過程において、各コドンがそれぞれ対応するアミノ酸に置換される。コドンの中にはあまり出現しない低頻度のコドンも存在し、その低頻度コドンに対応する tRNA もまた、細胞内において低濃度であることが報告されている。これは無駄な物は極力省くという生物の特徴に由来する事例であると同時に、低頻度コドンと対応する tRNA 間の情報伝達経路が細く、遺伝子発現における「脆弱性（セキュリティーホール)」と捉えることができる。そこで、この脆弱性を攻撃する遺伝子を設計し、その有効性について検証した。
【方法】本脆弱性を攻撃する手法として、情報伝達経路が細い部分に大量の情報要求を送る Denial of Service Attack(DoS 攻撃)を選択した。具体的には低頻度コドン対応 tRNA を大量に要求し、通常の遺伝子発現を阻害する方法である。緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子配列を元に、大腸菌またはヒトにおいて最低頻度となる人工遺伝子（*lgfp* または *hu-lgfp*）を合成し、大腸菌 K-12 株またはヒト細胞（Hela, MCF7, HEK293）において発現させ、その影響を調べた。さらに、ファージ（T4, T7, λ, f1, MS2）またはウイルス（Adeno virus）を宿主に感染させ、その増殖に対する *lgfp* または *hu-lgfp* 発現の影響を検討した。
【結果と考察】大腸菌において、*lgfp* を発現させた場合、その生育は阻害され増殖は止まった。しかし生菌数の低下は認められず、死滅することはなかった。また、GFP の発現も確認され、低頻度コドンで構成された遺伝子でも発現することがわかった。さらに、大腸菌の環境塩濃度に対する OmpF/C 適応も停止していた。*lgfp* が発現している大腸菌に各ファージを感染させた場合、ファージの増殖能は著しく低下し、溶菌による生菌数の低下もほとんど認められなかった。一方、ヒト細胞株で *hu-lgfp* の一過性発現を行った結果、各細胞の生菌数の低下が認められた。また、HEK293 株を用いた Adenovirus の感染実験では、ウイルス増殖率が約 6 倍と対照の約 80 倍と比較して著しく減少していることが明らかとなった。本人工遺伝子による増殖抑制効果は、特異的な抗菌活性、抗腫瘍性や抗ウイルス性のタンパク質に由来しないため、特別な分子生理学的な情報は不要である。また、コドン使用頻度に依存しているため、変異による耐性株や耐性ウイルスも出現しないという特徴もある。従って、研究が困難な稀少な疾病例や未知のウイルス感染にも効果が期待できる。
【参考文献】Kobayashi, H. Appl. Environ. Microbiol. 87. 2544-2553 (2015)

antibiotic, anti-tumor, antiviral

発表責任者：小林英城（hidekik@jamstec.go.jp）

講演番号：3A22a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A22 会場

高感度コリン応答型遺伝子スイッチの開発
Development of choline-responsive ultra-sensitive genetic switch
○小林 一幾、星野 孝幸、鈴木 紳一郎、河合（野間） 繁子、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Ikki KOBAYASHI, Takayuki HOSHINO, Shinichiro SHUZUKI, Shigeko KAWAI(NOMA), Daisuke UMENO (Chiba Univ.)

Escherichia coli 由来の転写制御遺伝子スイッチとして、Bet システムが知られている。このシステムでは、リプレッサ型転写因子 BetI が DNA 上の標的配列 betO と特異的に結合することで転写を抑制し、コリンとの複合化に伴う立体構造変化によって、BetI は betO との結合性を低下させる。こうして、コリン非存在時には下流遺伝子の発現は抑制され、コリン存在時には発現が誘導される。我々は、この機構を利用して、安全・安価なコリンを誘導物質とした遺伝子誘導系（Bet システム）の開発応用を進めてきた。従来の Bet システムの問題点であった発現誘導の緊縮性の低さは、BetI の機能改良によって実現済みである。しかし、誘導に必要とされるコリン濃度（～100mM）が高い点が本系の克服すべき問題として残っている。コリン親和性の高い BetI の取得をめざした努力はいずれも不成功であり、誘導濃度の低いコリン誘導系を得ることができなかった。

これらの結果から我々は、培地に加えたコリンの濃度と細胞内でのコリンの実効濃度の乖離に問題があると考えた。水溶性分子であるコリンは疎水性の細胞膜透過速度は極めて遅く、その取り込みはトランスポーターに依存した経路があることが知られている。また、細胞内に取り込まれたコリンは BetA 及び BetB により代謝されるため、細胞内のコリン濃度は低下し得る。そこで、コリンの細胞内への取り込み効率及び代謝経路の改善を試みた。具体的には、コリンインポータタンパク質 BetT の追加発現によって細胞内への取り込み量を増加させ、更に BetA 欠損によってコリン消費の抑制を試みた。その結果、従来の 1/1000 量（0.1mM 程度）のコリンで誘導される、非常に安価なコリン誘導系が実現した。また、本系はβ-メチルコリンやアセチルコリンなどの添加によっても誘導される。精製した BetI タンパク質の解析したところ、その高いコリン親和性が明らかになるとともに、アセチルコリンへの結合性は示さなかった。

genetic switch, synthetic biology, directed evolution

講演番号：3A22a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A22 会場

カイコーバクミド遺伝子発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫に対するワクチン開発の基盤構築

Development of vaccine platform against *Plasmodium falciparum* using silkworm-bacmid expression system

○稲垣 裕[1]、林谷 美貴子[2]、宮崎 剛亜[1,3]、デオ　ヴィピン クマル[4]、Murhandarwati Elsa Heridiana[5]、加藤 竜也[1,2,3]、朴 龍洙[1,2,3] ([1]静大院・総科技・農、[2]静大・農・応生化、[3]静大グリーン科技研、[4]静大　グローバル、[5]ガジャマダ大学)

○Yu Inagaki[1], Mikiko Hayashidani[2], Takatsugu Miyazaki[1,3], Kumar Deo Vipin[4], Heridiana Murhandarwati Elsa[5], Tatsuya Kato[1,2,3], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Dept., Agric., Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]College Global-Interdisciplinary Studies, Shizuoka Univ., [5]Dept. Parasitology, Fac. Medicine., Gadjah Mada Univ.)

【背景・目的】マラリアとは、プラスモジウム属に分類される寄生性原虫によって引き起こされる原虫感染症である。マラリア原虫はヒト体内で肝臓と赤血球内に寄生し、それぞれ形態を変化することが知られている。そのため効果的なワクチン開発が困難であるが、各形態の抗原を同時に免疫することで効果的にマラリアを予防できることが期待される。本研究では、熱帯熱マラリア原虫のワクチン候補抗原として知られている CSP (Circum Sporozoite Protein)と MSP3 (Merozoite Surface Protein 3)をワクチン開発の基盤構築のために、カイコ - バクミド発現系を用いて発現させ、生化学的解析を行った。さらに CSP では免疫応答を高めるために、ウイルス様粒子 (VLPs) 上への提示も試みた。

【方法・結果】CSP と MSP3 遺伝子をカイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドへ導入した。それぞれのタンパク質は C 末端に FLAG タグを付加して発現させた。CSP の場合、アフィニティークロマトグラフィーの後にセルファインサルフェイトを用いた精製を行い、MSP3 の場合はアフィニティークロマトグラフィーの後に疎水クロマトグラフィーを用いた精製を行った。その精製タンパク質を用いて、熱帯熱マラリア原虫に感染した患者から得られた血清を用いたウエスタンブロットを行った。MSP3 については、N 型糖鎖修飾についての解析を PNGase F と Endo H を用いて行った。CSP については、BmNPV 由来 GP64 タンパク質の膜貫通領域と融合させ (CSP-GP64TM)、ラウス肉腫ウイルスの構造タンパク質と共発現させた後に、ショ糖密度勾配遠心分離法による VLPs の分画を行い、ラウス肉腫ウイルス VLP 上への提示をウェスタンブロットなどで確認した。

【結果】カイコ体液から CSP および MSP を部分精製することができた。それぞれの組換えタンパク質を用いてヒト抗血清を用いたウェスタンブロットを行ったところ特異的なバンドが得られ、ヒト血清中に含まれる抗体と反応したことが確認された。MSP3 では Glycopeptidase F によって一部の糖鎖が切断され、Endo H では糖鎖が切断されないことが確認された。このことから、MSP3 には複数種類の N 型糖鎖が修飾されていることが示唆された。 CSP-GP64TM とラウス肉腫ウイルスの構造タンパク質と共発現させることで、カイコ体液中に両タンパク質の発現が確認され、密度勾配遠心分離法により同じ画分に両タンパク質が確認されたことから、CSP がラウス肉腫ウイルス VLP 上への提示がされていると示唆された。

Plasmodium falciparum, silkworm, antigen

講演番号：3A22a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A22 会場

Expression of Structural Protein of Dengue Virus serotype 3 using Silkworm Expression System
○Doddy Irawan Setyo UTOMO[1], Fithriyah SJATHA[2], Tatsuya KATO[1,3], Enock Y. PARK[1,3] ([1]Lab. Biotech, Dept. Agric., Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Microbiol, Fac. Med., Univ. Indonesia., [3]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

<Aim> Dengue is an arboviral disease, which threatens almost half the global population, and has emerged as the most significant of current global public health challenges. Dengue viruses (DENVs) are divided into 4 antigenically distinct serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4), and causes a dengue fever (DF), dengue haemorrhagic fever (DHF), or dengue shock syndrome (DSS) asymptomatically. As partial immunity by a vaccine can potentially sensitize to severe disease, a safe dengue vaccine must be tetravalent, capable of providing durable immunity simultaneously to all four DENV serotypes. Multiple approaches are being pursued towards developing a safe and efficacious dengue vaccine. In this study, structural proteins of dengue virus type 3 (DENV-3) was expressed in silkworms and purified from its fat body.

<Methods> The synthetic cDNA of the DENV-3 that contains capsid (C), premembrane (PrM) and envelope (E) gene (CPrM/E) with PA tag at C terminus was designed. The PrM/E cDNA have successfully isolated using PCR method with specific primers, with length 2,070 b. CPrM/E and PrM/E genes were inserted into *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid DNA, respectively. Each constructed recombinant BmNPV bacmid was injected into silkworm larvae and CprM/E and prM/E were expressed in silkworm larvae and pupae. In addition, these were also expressed in Bm5 cells. These proteins were purified from fat body of silkworm larvae by an affinity chromatography.

<Results> DENV-3 CPrM/E and PrM/E were expressed in the fat body and the pupae at its estimated molecular weights of 85 kDa and 75 kDa, respectively. These proteins were also expressed in Bm5 cells, but not in the culture supernatant. After its purification with anti-PA tag antibody beads, each protein band was observed at its estimated molecular weight in the elution fraction and additional bands were also observed at high molecular weight (over 200 kDa) and low molecular weight (30 kDa). We are doing receptor binding assay using heparin ELISA, and Transmission electron microscopy (TEM) for VLP morphological of these purified proteins.

Dengue, Virus-like particles, Silkworm

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A22a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A22 会場

抗体医薬開発に向けたニワトリ由来モノクローナル抗体のヒト化

Humanization of chicken derived monoclonal antibodies for antibody drug development

○坂田 知子、庄屋 雄二、粟田 ちひろ、坂下 真耶、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Tomoko Sakata, Yuji Shoya, Chihiro Awada, Maya Sakashita, Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【背景と目的】
我々は ALAgene(Avian Lead Antibody gene) technology というニワトリを用いたモノクローナル抗体作製技術を確立している。ニワトリ抗体を医薬品として利用する場合には、CDR(相補性決定領域)の移植によりヒト化を行う必要がある。一般的に、ヒト抗体の軽鎖はλ型に比べκ型の方が安定性などの点で有利であるが、ニワトリ抗体の軽鎖はλ型であることから、単にヒト軽鎖κ型由来のフレームワークに移植するだけでは、反応性の維持が困難であった。
以前より我々は、ニワトリ抗体軽鎖のヒト化において、可変領域フレームワークのκ型化を試みており、vernier zone と呼ばれる構造維持に重要とされるアミノ酸 2 残基をニワトリ配列へ置換することで、ヒトκ型化に成功している。今回我々は、CDR 配列等の違いによるヒトκ型化への影響を検証し、抗体に依らずニワトリ由来抗体のヒトκ型化が一般的に可能であることを確認するため、以前とは異なるニワトリ抗体のヒトκ型化を行い、2 種類の抗体によるヒト化の結果を比較した。
【方法】
ヒト化した抗体軽鎖κ型のフレームワークにおいて、vernier zone のアミノ酸に対して、ニワトリ抗体由来のアミノ酸へとバックミューテーションがランダムに入るよう設計された scFv 抗体ライブラリを作製した。本ライブラリを用いてスクリーニングを行い、抗原に対する反応性の高いクローンを取得した。配列を決定したクローンの一部は二価抗体へと組み換え、ELISA により反応性を確認した。
【結果】
スクリーニングにより 31 種の陽性クローンが得られた。ランダム化した vernier zone の 9 箇所のうち 7 箇所は、ヒトまたはニワトリ由来アミノ酸が出現し、1 箇所は全クローンがヒト型となった。しかし CDR の間に存在する残りの 1 箇所については、ニワトリ由来のアミノ酸に置換された抗体のみ活性を維持した。この結果より、抗体軽鎖のフレームワークをヒトκ型へと組換え、更に反応性維持のためにニワトリ由来アミノ酸へと置換する箇所は、1 箇所にまで削減可能であることが分かった。ニワトリ型である箇所は 2 種類の抗体に共通のアミノ酸であり、従って本アミノ酸残基はニワトリ抗体をヒトκ型化する際に、その反応性に大きく寄与する重要なアミノ酸残基であることを示唆している。本アミノ酸残基はニワトリ型 CDR 内の保存性の高いアミノ酸残基と立体構造上近接しており、両残基の相互作用が抗体の反応性を維持する上で必須であると考えられる。

antibody, chicken, humanization

講演番号：3A22a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A22 会場

カイコを用いたデングウイルス 2 型由来構造タンパク質の発現

Expression of structural proteins of dengue virus type 2 in silkworms

○市川 博野[1]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大院・総科技・農、[2]静大グリーン科技研)
○Hirono Ichikawa[1], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Park[1,2] ([1]Dept. Agric., Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】主に熱帯・亜熱帯地域を中心に全世界では年間約一億人がデング熱やデング出血熱を発症する。デングウイルスには 4 つの型があり、抗体依存性感染増強（Antibody Dependent Enhancement, ADE)現象がワクチン開発を難航させている。現時点では弱毒化ワクチンのみが存在するが、これは感染のリスクもあることから、使用が許可されている国は少ない。現在感染のリスクの少ない安全なワクチンの開発が求められている。本研究では、デングウイルス様粒子を開発するための前段階としてデングウイルス 2 型の構造タンパク質（C、prM および E タンパク質）をカイコ-バクミド発現系を用いて発現させた。

【方法】デングウイルス 2 型の構造タンパク質である C、prM および E（C-prM-E）タンパク質をコードする遺伝子と E タンパク質だけをコードする遺伝子を、それぞれ *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus（BmNPV）バクミドに挿入することで組換え BmNPV バクミドを構築した。これら組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫に注射し、体液および脂肪体から C-prM-E タンパク質と E タンパク質を回収した。得られたタンパク質を FLAG タグによるウェスタンブロットで確認後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。同時にカイコ細胞（Bm5）でもこれらのタンパク質発現も行い、比較検討を行った。

【結果】E タンパク質のみをカイコ幼虫で発現させたところ、抗 E タンパク質抗体によるウェスタンブロットによりカイコ脂肪体内で予想される分子量（約 55 kDa）付近に組換えタンパク質の発現が確認された。しかし、それよりも低い分子量（約 30 kDa）のバンドも確認された。C-prM-E タンパク質を発現させた場合にも、E タンパク質のみのときと同じバンドパターンが得られた。抗 prM 抗体によるウェスタンブロットにより、prM タンパク質発現もカイコ脂肪体および Bm5 細胞で確認された。カイコ体液から FLAG タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行ったところ、E タンパク質のみ発現しても、C-prM-E タンパク質を発現しても、抗 E タンパク質抗体に反応するタンパク質は、約 55 kDa および約 30 kDa であった。現在このデングウイルス様粒子を使用してデングウイルス受容体との結合解析を行っている。

Silkworm, Dengue virus, BmNPV

講演番号：3A22a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A22 会場

Expression of recombinant *Neospora caninum* profilin in *Bombyx mori*

○Hamizah Suhaimi[1], Rikito Hiramatsu[2], Tatsuya Kato[1,2,3], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Lab. Biotechnol, Dept. Biosci, Grad School.Sci. Technol, Shizuoka Univ., [2]Lab. Biotechnol, Dept. Appl. Biol. Chem, Coll. Agric,Grad School.Integ.Sci.Technol, Shizuoka Univ., [3]Lab. Biotechnol, Res Inst. Gn Sci. Technol, Shizuoka Univ.)

Abstract

<Aim>

Neosporosis, which is caused by *Neospora caninum* infection to the cattle, is the well-known disease in a veterinary area. Infected cattle may lead to the abortion via transplacental transmission from mother to foetus. Thus far, a number of studies have begun to develop the recombinant subunit vaccines as novel efficient vaccine candidates against Neosporosis. In this study, we expressed an innate immune protein, profilin from *Neospora caninum* (NcPROF) in Bm5 cells and silkworm larvae.

<Methods>

A gene encoding NcPROF fused with the transmembrane domain of GP64 (NcPROF-GP64TM) from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) was amplified by PCR. The NcPROF-GP64TM was fused with the sequence coding PA tag. A recombinant BmNPV bacmid containing this gene expression cassette was constructed. This recombinant bacmid was injected into silkworm larvae and the hemolymph and fat body were collected. This protein was also expressed in Bm5 cells using this recombinant BmNPV. Expressed proteins were confirmed by western blot and purified by an affinity chromatography.

<Results>

NcPROF-GP64TM was expressed both intra- and extracellularly in Bm5 cells. In addition, this protein was expressed in hemolymph and fat body of silkworm larvae. This indicated that NcPROF-GP64TM was secreted extracellularly even though this fusion protein has its transmembrane domain. NcPROF-GP64TM was purified from hemolymph using anti-PA tag affinity chromatography. Protein bands around 37 kDa, which is larger than its estimated molecular weight (26 kDa), were observed in SDS-PAGE after its purification.

Neosporosis, Silkworm expression system, *Neospora caninum* profilin

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A23a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A23 会場

皮膚のメラニン形成における制御性 T 細胞の機能に関する研究

Study on the role of regulatory T cells in skin melanogenesis

○青木 梨紗[1]、鵜浦 由里奈[1]、野口 真行[1]、増澤(尾﨑) 依[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大・生資科・生命化、[2]日大院・生資科・応用科)
○Risa Aoki[1], Yurina Unoura[1], Masayuki Noguchi[1], Yori Ozaki-Masuzawa[1], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】皮膚に認められる、いわゆるシミなどと呼称される色素が沈着する主な要因は紫外線である。紫外線暴露した皮膚では制御性 T 細胞（Treg）が集積することが知られており、皮膚は紫外線 B 波（UVB）の照射により免疫抑制状態に陥ることが考えられる。また、メラニンの脱落が原因である白斑は、Treg の機能の正常化により改善すること、メラニン形成に関与するαメラノサイト刺激ホルモンは Treg の分化を促進することなどが知られている。演者らは、これらの知見に基づいて Treg が皮膚の機能に関与する可能性を考えた。本研究では Treg 増殖抑制能を持つ抗 CD25 抗体を投与したマウスに UVB を照射するモデル実験系を用いて、メラニン形成における Treg の役割を解明する目的で基礎的な検討を行なった。
【方法】HR/DeF1 マウスを抗 CD25 抗体投与群、Control 抗体（isotype control）投与群の 2 群に分け、CRF-1 を自由に摂取させて、1 週間予備飼育した。予備飼育後、各抗体を 200μg/mouse で腹腔内投与し、その翌日から UVB の照射を開始した。抗体は週に 1 回投与し、UVB は週に 3 回照射した。照射期間中、色彩色差計を用いて皮膚の L 値を測定した。UVB 照射開始 2, 4 週目に皮膚とリンパ組織を回収し、皮膚組織はパラフィン包埋後に薄切してフォンタ・マッソン染色法によりメラニンを染色した。また、メラニンの生合成に関与する分子の発現について western blot 法により検討した。さらに、皮膚およびリンパ組織に局在する T 細胞をフローサイトメーターにより解析した。
【結果】FACS 解析により、UVB を照射した皮膚では、表皮への Treg 集積が確認された。そこで、各抗体投与後、UVB を照射したところ、Control 抗体投与群と比較して抗 CD25 抗体投与群で L 値の低下が認められた。また、抗 CD25 抗体投与群の皮膚組織においては、メラニンが多く観察された。これらの皮膚を Western blot により解析したところ、メラニン生合成酵素の 1 つであるチロシナーゼ関連タンパク質 1（TRP1）の発現が増加していた。リンパ組織の T 細胞に関しては、現在解析中である。抗 CD25 抗体投与による Treg 抑制状態で UVB を皮膚に照射すると、メラニン形成が促進することが示唆された。
【結語】Treg は皮膚のメラニン形成を抑制する可能性が明らかになった。

melanogenesis, Treg, skin

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A23a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A23 会場

飢餓が皮膚中ヒアルロン酸合成に及ぼす影響

Effects of starvation on hyaluronan synthesis in the skin

○山根 拓実、金野 凌介、岩槻 健、大石 祐一（東農大応生科）
○Takumi Yamane, Ryosuke Konno, Ken Iwatsuki, Yuichi Oishi (Tokyo Univ. Agric.)

【目的】発展途上国では飢餓状態の人々が約 8 億 5000 万人存在し、深刻な問題となっている。皮膚中のヒアルロン酸は保湿性の維持、血管新生、細胞の増殖など生命活動の維持に重要な役割を果たし、栄養状態により様々な影響を受けるといわれているが（Yamane et al. **Mol. Nutr. Food Res.** 2011, 55, S186-S192; Yamane et al. **Mol. Nutr. Food Res.** 2010, 54, S53-S61）、飢餓が皮膚におけるヒアルロン酸合成にもたらす影響は不明である。そこで本研究では、飢餓がラットの皮膚におけるヒアルロン酸合成に及ぼす分子メカニズムを検討した。
【方法】実験動物には、Wistar 系雄性ラット（5 週齢）を用いた。試験群は対照（CO）群と 18 時間絶食させた Fasting 群を設け、解剖後に皮膚を摘出した。皮膚中のヒアルロン酸量は ELISA 法で測定した。ヒアルロン酸の主要合成酵素である *rhas2*、*rhas3* およびその遺伝子発現を調節している *TGF-β1* の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。さらに、TGF-β1 の受容体である TGF-βRII のリン酸化をウエスタンブロッティング法で測定した。
【結果及び考察】体重は CO 群に比して Fasting 群で有意に減少した。皮膚中ヒアルロン酸量と *rhas2* 及び *rhas3* の mRNA 量は、CO 群に比して Fasting 群で有意に減少が認められた。*rhas2* 及び *rhas3* の発現を促進させる *TGF-β1* の mRNA 量を測定した結果、CO 群に比して Fasting 群で有意に減少した。また、TGF-βRII のリン酸化は、CO 群に比して Fasting 群で有意に減少した。以上より、飢餓状態では、ラット皮膚中 TGF-β1 が低下し、ヒアルロン酸合成が抑制される可能性が示唆された。

skin, hyaluronan, starvation

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

講演番号：3A23a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A23 会場

ショウジョウバエの高糖耐性に関する比較遺伝学的解析
Comparative genetic analysis of high-sugar tolerance in the fruit fly *Drosophila*
○阿部 真生子[1]、渡辺 佳織[2]、服部 佑佳子[2]、上村 匡[2,3]、丹羽 隆介[1,3]（[1]筑波大生物、[2]京都大院生命科学、[3]AMED-CREST）
○Maiko ABE[1], Kaori WATANABE[2], Yukako HATTORI[2], Tadashi UEMURA[2,3], Ryusuke NIWA[1,3]
([1]Univ. of Tsukuba, [2]Kyoto Univ., [3]AMED-CREST)

糖は、私たちが健康に生活していくために欠かすことのできない栄養素であり、生命活動の維持のためには適切な糖の摂取が必須である。その一方で、過剰な糖の摂取は、細胞内への中性脂肪の蓄積などの異常をもたらし、老化や生活習慣病など様々な病態を引き起こすことが知られている。生活習慣病の一つであるヒト糖尿病の研究も含め、糖の代謝・蓄積のメカニズムについて多くの研究が行われているが、その全貌は明らかになっていない。

今回我々は、動物の糖に対する耐性や寛容性を追究する目的で、遺伝学的研究に優れたモデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* およびその近縁種のセイシェルショウジョウバエ *D. sechellia* を用いた研究を実施した。我々は、グルコース濃度を変えたエサをショウジョウバエに与えた場合の体液中グルコース濃度と寿命の測定を行った。その結果、*D. melanogaster* と比較して、*D. sechellia* はエサ中の高グルコース濃度に対する耐性が低く、高糖状態のエサを摂取した *D. sechellia* の寿命は *D. melanogaster* と比べて顕著に短くなった。

D. melanogaster と *D. sechellia* は実験室において交配可能であり、不妊の雑種を得ることができる。そこで、この種間雑種成虫を作出し、グルコース濃度を変えたエサでの体液濃度と寿命を測定した。その結果、高グルコースエサを摂取した場合の体液糖度と寿命延長への影響は、*D. melanogaster* に近い性質を示した。この結果は、この 2 種のショウジョウバエの糖耐性の差は、*D. melanogaster* 側の染色体の持つ顕性要因によって強い影響を受けていることを示唆する。

現在、この顕性要因の原因となる遺伝子の特定を目指す第一段階として、*D. melanogaster* で整備されている欠失染色体系統群を用いた責任染色体領域の特定を目指している。本発表では、欠失系統マッピングの成果についても報告する。

Diabetes, Glucose, Drosophila

発表責任者：丹羽隆介（ryusuke-niwa@umin.ac.jp）

講演番号：3A23a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A23 会場

Mutational and Biochemical analysis of the dual kinase region of UNC-89 (OBSCURIN)

○Youhei MATSUNAGA, Guy BENIAN (Emory Univ.)

In *C. elegans*, unc-89 loss of function mutants display reduced locomotion, disorganized myofibrils and lack of M-lines. The largest UNC-89 isoforms at approximately 900,000 Da consist of 53 Ig domains, 2 Fn3 domains, a triplet of SH3, DH and PH domains near their N-termini, and two protein kinase domains (PK1 and PK2) at their C-termini. Nematode UNC-89 is the founding member of the UNC-89/obscurin family of proteins. UNC-89 is localized to M-lines. Homology modeling suggests that PK1 is catalytically inactive, whereas PK2 is catalytically active. Although we have found that both PK1 and PK2 interact with SCPL-1, a novel CTD-type protein phosphatase, and that PK1 interacts with LIM-9 (FHL2), the actual functions of these protein kinase domains are unknown. To begin to explore the in vivo functions of UNC-89 kinase domains, we have used CRISPR/Cas9 gene editing to create nematodes having an in-frame deletion of PK1 [*unc-89(sf23)*], or a putative catalytically inactive PK2 [*unc-89(sf22)*]. To make the catalytically inactive PK2, we changed a conserved lysine (K) that is involved in ATP coordination to alanine (A). We have shown that PK2 has catalytic activity in vitro, and we are in the process of verifying that this KtoA mutation eliminates kinase activity. *unc-89(sf22)* and *unc-89(sf23)* worms have normal sarcomere structure as assessed by immunostaining using antibodies to various sarcomeric proteins. Nevertheless, both mutants display reduced whole-body locomotion (swimming in liquid or crawling on agar). To help explain how these mutants move more slowly despite having normal myofibrils, we hypothesized that mitochondria might be defective in organization or function. We used two methods (Mitotracker staining, and muscle-specific expression of mitochondrial-localized RFP) to assess the organization of mitochondria. Each method shows that, as compared to wild type, *unc-89(sf22)* and *unc-89(sf23)* have mitochondrial networks that are broken or fragmented. The mitochondrial protein content (assessed by quantitative western blotting using antibodies to ATP synthase, ATP5A), however, is unaffected. As mitochondrial fragmentation usually indicates mitochondrial dysfunction, we are in the process of measuring ATP levels in these mutants.

Muscle, Mitochondria, Giant protein kinase

講演番号：3A23a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A23 会場

アギトアリ毒液成分の網羅的解析

A comprehensive venom analysis of the predatory ant *Odontomachus monticola*

○稲垣 英利[1]、数馬 恒平[2]、紺野 勝弘[3]、増子 恵一[4] ([1]産総研バイオメディカル、[2]名大院情報、[3]富山大和漢、[4]専修大学経営)
○Hidetoshi Inagaki[1], Kouhei Kazuma[2], Katsuhiro Konno[3], Keiichi Masuko[4] ([1]AIST, [2]Nagoya Univ., [3]Toyama Univ., [4]Senshu Univ.)

膜翅目（ハチ目）に属するアリ類は、多くの種で毒針から毒液を餌動物に注入し狩りをする。この毒液の構成成分、組成、活性などはアリの種によって大きく異なると思われるが、アリ毒液成分を網羅的に解析した研究例は少ない。我々は国内に生息するハリアリ類としては体サイズが最大のアギトアリ(*Odontomachus monticola*)から毒腺と毒嚢を摘出し、ここから毒腺 RNA と毒液を抽出し、次世代 DNA シークエンサー(NGS)および高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)によって解析した。

NGS (HiSeq 2500)から出力されたデータ 44,087,058 リード（平均鎖長 100 bp）を Trinity ソフトウエアでアッセンブルしたところ、49,639 コンティグ(N50 1,466 bp)を得ることができた。ここから重複するコンティグ、rRNA、バクテリア由来と推定される配列を除去し、41,764 コンティグを取得した。こうして得られたコンティグの相同性検索を UniprotKB に対して行ったところ、69.3%のコンティグが既知のタンパク質の遺伝子と相同性を有していた。この遺伝子の中には 92 種類の毒素タンパク質の遺伝子が含まれていた。

それぞれの遺伝子の相対的発現量を測定するために、新規にアッセンブルした 41,764 コンティグをリファレンス配列としてマッピングを行った。その結果、毒素タンパク質のコンティグには全リードの 45.1%がマッピングされた。なかでも 6 種類のピロスリン様ペプチド(PLP)のコンティグには、毒素タンパク質の転写産物に由来するリードの 98.5%がマッピングされた。その他のコンティグは、アイカラピン、キチナーゼ、ヒアルロニダーゼ、DPP4、ホスホリパーゼ A2、ICK 様ペプチド、ベノムアレルゲン 1-4、セリンプロテアーゼ、カルボキシエステラーゼなどをコードしていた。

同時に行った毒液の LC-MS 分析では、アミノ酸（ロイシン/イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン)、生理活性アミン（ヒスタミン、チラミン）に加えて、ピロスリン様ペプチド(PLP)の全長もしくは断片のペプチドを検出することができた。

現在、同定したピロスリン様ペプチドなどの生理活性を調べている。

Reference
Kazuma K, Masuko K, Konno K, Inagaki H. Toxins 2017, 9(323): 1-16.

ant, venom, peptide

講演番号：3A23a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A23 会場

アンドロゲンによる細胞骨格制御は、外生殖器の性差形成に不可欠である
New possible role of androgen for the formation of sexual differences of external genitalia

○鈴木 堅太郎、アセベド アルビン、山田 源（和歌山県立医大）
○Kentaro SUZUKI, Alvin ACEBEDO, Gen YAMADA (Wakayama Med. Univ.)

我々の器官には様々な性差がある。近年、器官のみならず病態の発症、増悪化にも性差があることがわかってきた。男性ホルモンであるアンドロゲンは、性差を惹起する因子として不可欠である。しかし、アンドロゲンがどのようにして性差を形成するのか、そのメカニズムは、未だによくわかっていない。

我々は、器官形成過程において顕著な性差を形成するマウス外生殖器の尿道形成過程をモデルとして、何が雌雄で異なるのか？組織学的解析および分子生物学的解析から性差を定義してきた。尿道形成過程は、アンドロゲン依存的にチューブ様の尿道を形成する過程であり、オス特異的に起こる現象である。これまでの解析から、雌雄間で発現に性差がある遺伝子が存在すること[1)]、間葉細胞の増殖に性差があること[2)]を明らかにしてきた。我々は、組織・細胞レベルでアンドロゲンの機能解析を可能にするため、組織スライスを使った組織器官培養系を確立した。この組織器官培養系を用いることで、アンドロゲン依存性の尿道形成過程を２日間で再現することができる。さらに、組織器官培養系を応用して、細胞挙動をライブで観察することが可能なライブでイメージングシステムを樹立した。

本大会では、組織器官培養を使って新たに見出したアンドロゲン依存性の細胞骨格制御の重要性、さらに、エストロゲン様活性や抗アンドロゲン活性を評価する新たな評価系への応用の可能性についても論議したい。

参考文献

１）Suzuki K., et al,
Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethral formation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 111(46):16407-16412, 2014.
２）Suzuki H., Matsushita S., Suzuki K., Yamada G.
5α-Dihydrotestosterone negatively regulates cell proliferation of the periurethral ventral mesenchyme during urethral tube formation in the murine male genital tubercle.
Andrology, 5(1):146-152. 2017.

cytoskeletal regulation, androgen, sexual differences

発表責任者：鈴木堅太郎（k-suzuki@wakayama-med.ac.jp）

講演番号：3A23a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A23 会場

ClpXP によるミトコンドリア DNA 遺伝子発現制御の解析

Drosophila protease ClpXP specifically degrades DmLRPPRC1 controlling mitochondrial mRNA and translation

○松島 雄一[1]、廣藤 雄太[1,2]、康 東天[1] ([1]九州大医、[2]九州大歯)
○Yuichi Matsushima[1], Yuta Hirofuji[1,2], Dongchon Kang[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu University)

ミトコンドリアマトリクスには Lon、ClpXP、m-AAA の 3 種のプロテアーゼが存在し、これらはバクテリアからヒトまで広く保存されている。Lon、ClpXP はミトコンドリアマトリクスに局在し、m-AAA はミトコンドリア内膜の膜タンパク質でマトリクス側にプロテアーゼ活性をもつ。これらたった 3 種のプロテアーゼがミトコンドリアマトリクスタンパク質を分解することでタンパク質の異常な蓄積などを防ぎ、ミトコンドリア機能を正常に保っていると考えられている。しかし、一部のタンパク質は特定のプロテアーゼによって特異的に分解されることが知られているが、その例は未だ少ない。また最近では、これらプロテアーゼの遺伝子変異がそれぞれ異なる疾患を引き起こすことも明らかになってきた。

ClpXP は ClpP と ClpX の２つのサブユニットから構成され、ClpP が 7 量体のリング状構造を２つ重ねた１４量体構造をとり、その両端に 6 量体リング状構造を取った ClpX がそれぞれ配置されている。ClpP はプロテアーゼ領域を持ちタンパク質分解に寄与し、一方 ClpX はシャペロン様活性(ATPase 活性)を持ち基質の選択や効率的なタンパク質分解に寄与している。ClpP の遺伝子変異が、ミトコンドリア病の一種であるペロー症候群の原因となることが最近明らかにされた。

我々はショウジョウバエ培養細胞を用いて ClpP ノックダウン細胞株を作成した。ClpP ノックダウン細胞では一部のミトコンドリア mRNA 量の上昇に加え、ミトコンドリア RNA のプロセシングの異常やミトコンドリア翻訳の低下が観察された。またドミナントネガティブ型(プロテアーゼ活性欠損型)ClpP の過剰発現細胞や ClpX のノックダウン細胞株でも同様の結果が得られた。これらの表現型は特定の RNA 結合タンパク質の過剰発現細胞株でも観察され、またこのタンパク質は ClpXP によって特異的に分解されることが明らかになった。このことは Lon や m-AAA と同様に ClpXP もタンパク分解を介して mtDNA の遺伝子発現を制御していることを示している。

mitochondria, mtDNA, protease

発表責任者：松島雄一（matsush5@cclm.med.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A23a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A23 会場

ホスファチジルイノシトール定量法の新規開発と細胞内主要リン脂質クラスの定量的解析

Development of method for phosphatidylinositol measurement and comprehensive analysis of major cellular phospholipid classes

○辻 徳治[1]、森田 真也[1,2]、池田 義人[1]、寺田 智祐[1]（[1]滋賀医大・病院薬、[2]AMED-PRIME）
○Tokuji TSUJI[1], Shin-ya MORITA[1,2], Yosito IKEDA[1], Tomohiro TERADA[1]（[1]Department of Pharmacy, Shiga University of Medical Science Hospital, [2]AMED-PRIME）

【目的】生体膜の構成成分であるリン脂質は、哺乳動物において主に、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL)、スフィンゴミエリン (SM)の 8 クラスに分けられる。リン脂質の代謝異常は、動脈硬化などの疾患に関与しており、血中リン脂質量の微細な変化が、疾患の発症や進行に影響すると考えられる。しかし、従来の薄層クロマトグラフィーを用いたリン脂質定量法では、微量試料からのリン脂質の定量が困難であり、リン脂質量の変化と疾患との関連を明らかにするためにも、より高感度なリン脂質クラス定量法の開発が求められている。これまでに我々は、PI 以外のリン脂質クラス（PA・PC・PE・PS・PG・CL・SM）に対する『酵素蛍光定量法』を順番に開発してきた。本定量法は、各リン脂質クラスに特異的な一連の酵素反応系から生じる蛍光物質の蛍光強度を測定する手法であり、標的リン脂質クラスを pmol 単位で高感度に検出可能である。本研究では、主要リン脂質クラスとして残る PI の酵素蛍光定量法を新規に開発することで、微量試料中に含まれるリン脂質 8 クラスの網羅的な定量を可能にする。
【方法】Folch 法によってヒト胎児腎由来 HEK293 細胞から脂質抽出を行った。脂質抽出液中に含まれる各リン脂質クラスの定量には、酵素蛍光定量法を用いた。
【結果】PI 酵素蛍光定量法の検出限界は 2 μM（反応溶液中 20 pmol）であり、アシル鎖の違いは測定に影響しなかった。PI 添加回収試験では、脂質抽出液に添加した既知量の PI をほぼ完全に定量することができた。また、脂質抽出液の希釈試験では、希釈率に比例して蛍光強度が低下し、高い直線性が得られた。これにより、本定量法の妥当性を確認した。次に、細胞内全リン脂質クラス量と細胞密度との関係を検討した結果、細胞密度の増加に伴って PI 量が増加した。また、PI と同様、細胞密度の増加に伴って PC、PE、SM 量は増加し、逆に PS、PA、PG+CL 量は低下した。
【考察】細胞内 PI 量の変化を検出できる定量法を開発したことで、微量試料からでも、哺乳類細胞の細胞膜を構成する主要リン脂質 8 クラスの網羅的な定量が実施可能となった。これにより、リン脂質クラスの生合成が細胞密度の変化に応じて制御されていることが本研究から示された。完成した「全主要リン脂質クラス網羅的定量法」は、リン脂質代謝機構の解明に有用であり、動物実験や植物、微生物を対象とした研究にも幅広く応用可能である。本手法は今後、リン脂質代謝に関する研究や、リン脂質が関わる疾患メカニズムに関する研究の発展に貢献することが期待できる。

phospholipid, phosphatidylinositol, Enzyme-based fluorometric method

発表責任者：森田真也（smorita@belle.shiga-med.ac.jp）

講演番号：3A23a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A23 会場

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸によるオートファジーの制御

Role of phosphatidylinositol 4-phosphate in autophagy

○石川 遥菜、伊藤 昭博、前本 佑樹（東京薬大・生命）
○Haruna ISHIKAWA, Akihiro ITO, Yuki MAEMOTO (Tokyo Univ. Pharm Life Sci., Sch. of Life Sci)

【目的・背景】

オートファジーは、細胞質のタンパク質などをリソソームで分解するシステムで、酵母や高等動植物に至るまで非常によく保存されており、栄養飢餓におけるアミノ酸供給に重要な細胞内システムである。オートファジーは、mechanistic target of rapamycin complex 1（mTORC1）の不活性化によって誘導される。アミノ酸や成長因子存在下では mTORC1 により抑制されているが、飢餓条件下になると mTORC1 による抑制が解除され、ULK 複合体が活性化し、ホスファチジルイノシトール-3-一リン酸（PI(3)P）を産生することでPI(3)P結合タンパク質のオートファゴソーム形成起点への局在化を促す。その後、ホスファチジルエタノールアミン（PE）化された LC3（LC3-II）が隔離膜上に局在し、隔離膜の伸長が促進され、オートファゴソームが形成される。伸長した隔離膜は基質を閉じ込めるために閉鎖する必要があるが、膜閉鎖がどのように制御されているかは明らかではない。近年、リソソーム膜の伸長等に PI(4)P、PI(4,5)P2 が関与することが明らかになった。そこで本研究では、オートファジー誘導におけるリン脂質の関与を明らかにすることを目的とし、オートファゴソームの形成に対する PI4 リン酸化酵素 III（PI4KIII）阻害剤の効果を検討した。

【結果・考察】

PI4KIIIは主に細胞膜と小胞体に局在するPI4KIIIαとゴルジ体に局在するPI4KIIIßが存在する。どちらの酵素がオートファゴソームの形成に関与するのか、特異的な阻害剤を用いて検討した。最初に、HeLa細胞を用いて栄養またはアミノ酸飢餓条件下における単位時間あたりに増加するLC3-IIの量を指標にオートファジー誘導に対する効果を調べた。その結果、PI4KIIIα阻害剤を処理したときのみLC3-II産生量が低下したことから、PI4KIIIαはオートファジーを制御することが示唆された。次にメカニズムを明らかにする目的で、LC3の細胞内局在を検討したところ、PI4KIIIα阻害剤処理によりLC3陽性のドット構造が減少した。このときウェスタンブロット解析ではLC3-IIが検出されていたため、PI4KIIIα阻害剤はLC3のPE化には影響しないで、その局在に影響を与えることによりオートファゴソームの形成に関与することが示唆された。これは、これまで知られているオートファジー阻害剤とは全く異なるメカニズムであり、PI4KIIIαにより産生されるPI(4)Pは新しい作用機序でオートファゴソームの形成を制御している可能性が示唆された。

Autophagy, PI(4)P

講演番号：3A23a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A23 会場

リサイクリング経路におけるリン脂質分解酵素 PA-PLA1 の機能解析

Functional analysis of PA-PLA1,Phosphatidic Acid (PA)-preferring Phospholipase A1 in recycling pathway

○本橋 愛依、前本 佑樹、根本 和彰、伊藤 昭博（東京薬大・生命）
○Manae MOTOHASHI, Yuki MAEMOTO, Kazuaki NEMOTO, Akihiro ITO (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., Sch. of Life Sci.)

【目的・背景】

ホスホリパーゼ A_1 (PLA_1) はリン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、局在部位によって細胞内型と細胞外型に分類されている。ホスファチジン酸 (PA) 選択的 PLA_1 ($PA\text{-}PLA_1$) は、PA に対して活性を示す細胞内型ホスホリパーゼ A_1 として同定され、生体内では脳や脊髄に高く発現し、遺伝性痙性対麻痺 (HSP) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であることが報告されている。PA は膜の変形に関わり、エンドソームを介した様々な膜輸送に関与するリン脂質である。これまでに PA はリサイクリングエンドソームのチューブ状構造の形成に関与し、リサイクリング経路の調節に働くことが報告されている。また、神経突起末端の膜供給において、リサイクリング経路および PA の重要性が示唆されている。一方、リサイクリングにおける $PA\text{-}PLA_1$ の役割には不明な点が多い。今回、$PA\text{-}PLA_1$ ノックアウト細胞を用いて、リサイクリングにおける $PA\text{-}PLA_1$ のホスホリパーゼ活性の重要性について検討した。

【結果・考察】

$PA\text{-}PLA_1$ をノックアウトした HeLa 細胞において、エンドソームの形態異常が見られるかどうか検討した。初期エンドソームマーカーとして EEA1、リサイクリングエンドソームのチューブ構造のマーカーとして syndapin2 に対する抗体を用いた間接蛍光免疫染色を行ったところ、$PA\text{-}PLA_1$ ノックアウト HeLa 細胞において、初期エンドソームの肥大化とリサイクリングエンドソームのチューブ構造の増加が認められた。そこで、これらの形態異常のリサイクリング機能に対する影響を調べるため、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソームを経て細胞膜へと輸送されるトランスフェリンのリサイクリング速度を検討した。その結果、ノックアウト細胞ではコントロール細胞に比べてトランスフェリンの輸送速度が速まり、その輸送促進は野生型 $PA\text{-}PLA_1$ のレスキュー実験により回復するのに対し、ホスホリパーゼ不活性変異体 ($PA\text{-}PLA_1^{S537A}$) では回復しなかった。一方、初期エンドソーム、後期エンドソームを介してリソソームへと輸送される EGFR の分解速度には影響が見られなかった。以上の結果から、エンドソームにおいて $PA\text{-}PLA_1$ のホスホリパーゼ活性は、エンドソーム膜脂質である PA の量を調節することによってリサイクリングエンドソームの形態を制御し、リサイクリング経路の調節に関わることが示唆された。

Phospholipase, Phosphatidic Acid, recycling

講演番号：3A23a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A23 会場

ホスファチジルセリンを介してリサイクリングエンドソームに局在する低分子量 G タンパク質 Rab の機能解析

Analysis of Small GTPase Rab functions on Recycling Endosome through Phosphatidylserine

○國田 凌輝、森 昌人、大橋 貴生、藤山 和仁、三崎 亮 (大阪大・生物工学国際交流センター)
○Ryoki KUNITA, Masahito MORI, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA, Ryo MISAKI (Osaka Univ.)

[背景・目的]

リサイクリングエンドソーム(RE)は、細胞内小器官の一つであり、細胞内外の受容体などをリサイクルする再回収経路を制御することで見出された。しかしながら近年の研究から RE の機能は再回収経路にとどまらず、ウイルスタンパク質の細胞膜へのエキソサイトーシス、病原菌毒素のゴルジ体への逆行輸送といった複数の細胞内輸送経路を制御することが明らかとなった。さらに、他の細胞内小器官と異なり、膜表面に豊富なホスファチジルセリン(PS)を介して特定の分子を輸送しているという報告もある。このように多様な機能が注目されつつある RE であるが、他の機能や局在タンパク質の同定はまだまだ不十分である。

本研究では、RE の機能を解明するために、RE の主要膜成分である PS と、小胞輸送のモータータンパク質の役割を担う低分子量 G タンパク質 Rab に注目した。先行研究において、マウス由来 60 種の Rab の中から、膜表面の PS を介して RE に局在する Rab23 を見出した。そこで Rab23 が RE 上で細胞内輸送を制御するメカニズムを解明するため、Rab23 発現抑制下での細胞内輸送を観察するとともに Rab23 特異的エフェクタータンパク質の同定を目指した。

[結果]

SiRNA を用いて Rab23 をノックダウンしたアフリカミドリザル腎臓由来 COS-1 細胞では、ゴルジ体への特定のタンパク質輸送が阻害されることが分かった。続いて、3×FLAG - Rab23Q68L 恒常活性変異型をコードする遺伝子を発現するベクターを作製し、COS-1 細胞に導入した。当該細胞より抽出した全可溶性タンパク質に対して抗 FLAG 抗体を利用したアフィニティーカラム精製を行い、Rab23 に結合していたタンパク質を取得した。次に、精製タンパク質を In gel digestion 法によりゲル内消化、回収し、LC-MS/MS を利用し、タンパク質の同定を行った。結果、エフェクタータンパク質の候補として、Annexin－A2 と Annexin－A5 を見出した。Annexin ファミリーはリン脂質結合タンパク質であり、特に Annexin－A5 は PS と強く結合することが報告されている。また、Annexin - A2 は S100A10 と四量体を形成することで、細胞内の分子輸送に関与していることが知られている。

Recycling Endosome, Small GTPase Rab, Phosphatidylserine

発表責任者：三崎亮（misaki@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A23a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A23 会場

低分子量 GTPase Rab11 に対する新規 GDP/GTP 交換因子（GEF）である SH3BP5 および SH3BP5L の哺乳類細胞における生理機能の解析

Analysis of physiological function of SH3BP5/SH3BP5L as novel GEFs for the small GTPase Rab11 in mammalian cells

○諸岡 信克、佐藤 美由紀、佐藤 健（群馬大生調研）
○Nobukatsu MOROOKA, Miyuki SATO, Ken SATO (Gunma Univ.)

(目的)低分子量 GTPase の Rab11 はヒトにおいて 3 種類（Rab11a、Rab11b、Rab25）存在し、メンブレントラフィックと呼ばれる物質輸送を介して細胞の高次機能の維持に働いている。Rab は特異的な GDP/GTP 交換因子（GEF）により不活性体の GDP 結合型から活性体である GTP 結合型に変換され、膜への局在およびエフェクターとの相互作用が可能になり、生理機能を発現する。しかしながら、最近まで Rab11 の GEF は同定されていなかった。我々は線虫研究を通じて Rab11 特異的な新規 GEF である RAB-11-interacting protein-1（REI-1）を発見した。REI-1 は線虫初期胚において RAB-11.1（線虫 Rab11）を後期ゴルジ体にリクルートすることによって正常な細胞分裂を制御する。ヒトでは REI-1 のホモログとして SH3 domain-binding protein 5（SH3BP5）および SH3BP5-like（SH3BP5L）が存在する。これらは既知の GEF に共通する Rab-GEF ドメインを持たない構造上の特徴もつ。さらに、SH3BP5/SH3BP5L の哺乳類細胞における生理機能は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、SH3BP5/SH3BP5L の各 Rab11 に対する GEF 活性の有無と哺乳類細胞における生理機能を明らかにすることを目的とした。
(方法・結果) REI-1 の GEF 活性はリポソーム存在下で増強される。そこでまず、作製したリポソームの存在下で SH3BP5/SH3BP5L の各 Rab11 に対する GEF 活性を解析した。その結果、どちらの GEF も全ての Rab11 に対して GEF 活性を有することが明らかとなった。次に、GFP 融合タンパク質を発現させた Hela 細胞を用いて、SH3BP5/SH3BP5L の細胞内局在性を解析した。これらの細胞にトランスフェリンを取り込ませたところ、SH3BP5/SH3BP5L との部分的な共局在が認められた。また、リサイクリングエンドソーム（RE）のマーカーである Rab11a とも共局在を示したことから、SH3BP5/SH3BP5L は主に RE に局在することが明らかとなった。さらに、予備的な実験であるが、SH3BP5 または SH3BP5L をノックアウトした血球系由来の細胞において、トランスフェリンのリサイクリングの遅延と細胞移動の抑制が観察された。現在は、CRISPR-Cas9 システムで SH3BP5/SH3BP5L をノックアウトした Hela 細胞を作製しており、機能解析を行う予定である。

Rab11, GEF, SH3BP5

講演番号：3A23a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A23 会場

線虫 C.elegans R13A5.9 の腸における機能
The role of C.elegans R13A5.9 in intestinal cells
○田村 耕太、辻 俊祐、坂田 和実、小栗栖 太郎（岩手大学）
○Kota TAMURA, Syunsuke TUZI, Kazumi SAKATA, Taro OGURUSU (Iwate Univ)

線虫の R13A5.9 は膜タンパク質と予想され、類似度の高いホモログが哺乳類に存在する。変異体は低い運動速度、少ない産卵数、低い孵化率、腸細胞内での卵黄タンパク質の蓄積を示す。シナプス小胞またはその周辺に強い発現が観察され、変異体においてはシナプスにおける神経伝達物質の放出が少なく、シナプス小胞が蓄積することを報告した(Ogurusu *et al.*, BBRC 463:994-998 (2015))。変異体の腸においては卵黄タンパク質の分泌が少ないため卵の栄養状態が不良となり、少ない産卵数と低い孵化率を示すと予想している。本研究では、R13A5.9 の腸における機能を検討するため、蛍光タンパク質をマーカーとして解析を行った。

R13A5.9::GFP および R13A5.9::DsRed-Monomer は腸細胞内の基底膜側で網状の分布パターンを示し、網目の部分に卵黄タンパク質 YP170::GFP および YP170::DsRed-Monomer が観察された。R13A5.9::GFP とゴルジ体マーカーF58H1.3::DsRed-Monomer の共局在は観察されなかった。リサイクリングエンドソームマーカーの DsRed-Monomer とも共局在を示さなかった。初期エンドソームマーカーRab-5::DsRed-Monomer と弱い共局在を示した。クラスリン非依存性の初期エンドソームから形成されるリサイクリングエンドソームのマーカーである Rab-10::DsRed-Monomer のドット状の蛍光シグナルとは重複していないが非常に近接して存在していた。

以上の結果は、R13A5.9 は腸内において分泌物である卵黄タンパク質および初期エンドソームおよびリサイクリングエンドソーム付近に存在することを示しており、R13A5.9 の卵黄タンパク質分泌への関与を支持する。変異体の腸内に卵黄タンパク質が蓄積すること、シナプス小胞が蓄積することを考慮すると、R13A5.9 は神経や腸での分泌に必要と考えられる。

exocytosis, membrane trafficking, C.elegans

講演番号：3A23a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A23 会場

線虫 *C.elegans* R13A5.9 変異体へのマウスホモログ導入の効果
Effects of expression of mouse homolog of *C.elegans* R13A5.9 in mutant worms.
○昆野 諒、小栖栗 太郎、坂田 和実 (岩手大学)
○Ryo KONNO, Tarou OGURUSU, Kazumi SAKATA (Iwate Univ.)

線虫 R13A5.9 はアミノ酸配列から膜タンパク質と予測され、シナプス小胞からの神経伝達物質の分泌に関与していることを報告した(Ogurusu *et al.*, BBRC 463:994-998 (2015))。R13A5.9 のマウスホモログのうち、N 端の最初の膜貫通領域と予想される配列を欠いているものはマクロファージの MHC receptor 2 であることが報告されている(Tashiro-Yamaji *et al.*, Gene 384:1-8 (2006))。本研究では、マウスホモログと R13A5.9 の機能を比較するため、R13A5.9 の機能を喪失した線虫にマウスホモログを発現させ、表現型の変化を観察した。線虫 *R13A5.9* プロモータの制御下にマウスホモログを発現させるために以下の３種類の発現ベクターを gateway system (invitrogen)により構築した。マウスホモログの C 端に DsRed-Monomer を融合 (J1)。R13A5.9 の最初の膜貫通領域と最初の膜貫通領域を欠いたマウスホモログのキメラタンパク質の C 端に DsRed-Monomer を融合 (J2)。最初の膜貫通領域を欠いたマウスホモログの C 端に DsRed-monomer を融合(J3)。これらを R13A5.9 の機能を喪失した変異体に発現させて、表現型の変化を測定した。変異体の運動速度は野生型の約半分であるが、R13A5.9 と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させることにより完全に回復した。そこで、マウスホモログの 3 種類の融合タンパク質発現ベクターを導入後に、それぞれの運動速度を計測した。M9 溶液中で線虫の 1 分間のくねり回数を計測した。それぞれ無作為に 10 匹ずつ選び、1 匹に対し 1 分間の計測を計 5 回行った。R13A5.9 の機能を喪失した変異体：48.24±5.22 (標準偏差) 回、J1：68.74±6.98 回、J2：71.42±7.80 回、J3:73.92±8.32 回、野性型：111.54±7.52 回とマウスホモログの 3 種類の融合タンパク質の発現ベクターを導入したすべての変異体において、運動速度が有意に増加した。この結果から、マウスホモログは R13A5.9 の機能を代換できることが示唆された。また、最初の膜貫通領域と予測される領域は機能に必須ではないと考えられる。

synaptic vesicle, exocytosis, *C.elegans*

講演番号：3A23a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A23 会場

細胞骨格βアクチンの C 末端側断片によるアポトーシス誘導機構の解析

Analysis of apoptotic mechanism induced by the C-terminal fragment of cytoskeletal ß-actin.

○伊東 奈那子[1]、田中 眞人[1,2] ([1]東京電機大・院・生命理工、[2]東京電機大・理工)
○Nanako ITO[1], Masato TANAKA[1,2] ([1]Grad. sch. of Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

βアクチンは、カスパーゼ 3 の切断認識配列が 3 か所存在するので、アポトーシス発動時に結果として分解されると考えられている。真島らは、エトポシドを投与して細胞死を誘導された接着系ガン細胞から 15kDa - βアクチン断片を検出した。この 15kDa 断片にエピトープタグまたは EGFP タグを融合し、細胞に遺伝子導入すると、アポトーシスに似た形態変化を引き起こすが、カスパーゼを活性化しないと報告していた(*Oncogene* **18**, 2423, 1999)。

我々は、融合タグのない 15kDa 分子自身のアポトーシス機構への影響を調べるため、15kDa 断片と蛍光タンパク質をそれぞれ同時発現できるプラスミドを開発し、アポトーシス・アッセイを実施した。接着系ガン細胞である HEK293、HeLa S3、COS-7 に 15kDa 断片を強制発現させると、GFP 標識細胞が培養基質への接着能を失って培地中に遊離することを見出した。これら遊離細胞のほとんどが核凝縮し、カスパーゼ 3 が活性化していた。この細胞死はカスパーゼ阻害剤によって抑制され、遊離細胞の DNA 断片化が TUNEL 法によって検出された。この現象は浮遊系ガン細胞である Jurkat 細胞でも、全く同様であったため、15kDa 断片による細胞死は細胞剥離によるアノイキスではなく典型的なアポトーシスを誘起した結果と考えられる。15kDa 断片を導入した Jurkat 細胞の約 68%でアネキシン V 陽性、即ち、ホスファチジルセリンの外在化が検出され、ヨウ化プロピオジウム（PI）陰性であったことから 15kDa 断片は、アポトーシス実行過程の初期ステージを誘起していると考えられた。15kDa 断片の C 末端または N 末端側に、エピトープタグや蛍光タンパク質タグを融合させると、この細胞死は誘起されなかった。従って、15kDa アクチンによる細胞死の誘導には、特定の箇所で正確に切断されたβアクチン 15kDa 断片の構造が必要であることを示し、15kDa 断片はアポトーシスの最終産物ではなく、細胞死の実行過程を強力に促進する働きがあるものと思われる。

ところで 15kDa 断片には、細胞骨格アクチンの重合に関与する低分子量のタンパク質であるプロフィリンが結合する可能性がある。この細胞死に対するプロフィリンの影響を調べるため、15kDa 断片とプロフィリンを、我々が開発した発現系で同時発現させ、細胞死アッセイを行った。その結果、プロフィリンのすべてのアイソフォーム、I～IV に抑制作用があることが示され、15kDa 断片による細胞死の実行過程をプロフィリンが制御している可能性が示唆された。プロフィリン発現の消長がガン細胞の悪性化と相関関係にあることが、最近の分子疫学／ゲノム疫学で明らかにされつつあり、抗がん剤が引き起こす細胞死と抗がん剤耐性獲得機構との関連性は極めて興味深い。

cytoskeletal actin, apoptosis, profilin

講演番号：3A23p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A23 会場

核内 mRNA 代謝阻害活性を持つ化合物の探索とその分子基盤の解析

Screening of the compound which inhibits mRNA processing and analysis of its function.

○三宅 俊太郎、西野 勝俊、神戸 大朋、永尾 雅哉、増田 誠司（京大院生命）
○Shuntaro MIYAKE, Katsutoshi NISHINO, Taiho KAMBE, Masaya NAGAO, Seiji MASUDA (Grad. Sch. Biosci. Kyoto Univ.)

真核生物では、核内の染色体 DNA を鋳型として最初に pre-mRNA として転写される。pre-mRNA は、核内で各種プロセシングを経て成熟 mRNA となる。プロセシングが完了した成熟 mRNA は、核内から核膜孔を通過して細胞質へと輸送され、細胞質でタンパク質翻訳の鋳型となる。一方、プロセシングを完了していない mRNA は核内に保持される。すなわち、mRNA プロセシングを阻害すると、mRNA は核内に蓄積する。この表現系を利用して mRNA プロセシングを制御できる化合物を探索することができる。本研究は、mRNA プロセシングを制御する化合物を見出し、その制御を通して遺伝子発現にどのような変化をもたらすか、またその標的となっているタンパク質は何か、さらにこれらの化合物の構造と活性・機能との相関関係はどのようなものか、といった作用機構を明らかにすることを目指して研究を行った。

mRNA プロセシングが阻害されると poly(A)＋RNA が核内に蓄積されることを利用して、蛍光 in situ hybridization 法によって poly(A)＋RNA の局在を観察し、核内蓄積がみられる薬剤を探索した。また、選別した薬剤が核内のどの部位に poly(A)＋RNA の蓄積を示すかについて、核スペックルマーカーの SC35 との共染色により観察した。

スクリーニングの結果、mRNA の核内蓄積をもたらす薬剤を 7 種得た。7 種のうち 5 種については SC35 との共局在がみられたが、2 種については共局在がみられないことが判明した。現在、細胞内標的や標的遺伝子の解析を進めている。本学会ではこれらの結果を含めて議論を進めていきたい。

mRNA processing, nuclear speckle, U2OS cell

講演番号：3A23p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A23 会場

小胞体の COPII 小胞出芽領域におけるカルシウム・イメージングとカルシウムチャネルの探索
Calcium imaging in the endoplasmic reticulum exit site (ERES) and searching for ERES-localized calcium channels.

○松下 明理[1]、高橋 維朝[2]、林本 敬大[2]、高原 照直[2]、柴田 秀樹[2]、牧 正敏[2] ([1]名大農・応生科、[2]名大院・生命農)
○ Akari MATSUSHITA[1], Fusanori TAKAHASHI[2], Takahiro HAYASHIMOTO[2], Terunao TAKAHARA[2], Hideki SHIBATA[2], Masatoshi MAKI[2] ([1]Nagoya Univ. School of Agriculture, [2]Nagoya Univ. Graduate School of Agricultural Sciences)

【背景・目的】小胞体で合成されたタンパク質は、小胞体の ERES（endoplasmic reticulum exit site、小胞出芽領域）において形成される COPⅡ輸送小胞に積み込まれゴルジ体へ輸送される。小胞体が細胞質全体に網目状に分布するのに対し、ERES は免疫染色像でドット状に散在し、細胞あたり 100 以上存在する。当研究室では、5 つの EF-hand を持つカルシウム結合タンパク質 ALG-2（apoptosis-linked gene 2）が、COPⅡ小胞の外被覆を形成する Sec31A とカルシウム依存的に結合すること、および ALG-2 がカルシウム依存性リン脂質結合タンパク質アネキシン A11 と協調して、Sec31A の ERES 局在を安定化させていることを明らかにした。さらに最近、ALG-2 とそのパラログ peflin が ERES からのコラーゲン前駆体の搬出を制御することが報告された。これらのことから、ERES では何らかの分子がカルシウムを供給し、カルシウム濃度が上昇していると考えられる。そこで本研究では、ERES のカルシウム濃度の測定と ERES においてカルシウム放出を担うカルシウムチャネルの同定を目指した。
【方法・結果】ERES のカルシウム濃度を測定するために、COPⅡ小胞の内被覆を構成し ERES に局在するタンパク質である Sec23A とレシオメトリック・カルシウムセンサーである GEM-GECO1 の融合タンパク質（Sec23A/GEM-GECO1）を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立した。まず抗 Sec23A 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりその発現量を確認したところ、Sec23A/GEM-GECO1 は内在性 Sec23A と同程度の発現量であった。また、免疫染色によって、Sec23A/GEM-GECO1 がドット状に分布し、Sec31A と共局在していることを確認した。次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞観察をおこなった。その結果、細胞質と同程度のカルシウム濃度をもつ Sec23A/GEM-GECO1 陽性のドットと細胞質よりカルシウム濃度の高いドットが存在することが明らかになった。これらの結果は、カルシウム濃度の高い ERES の存在を示唆している。

ALG-2 と Sec31A の ERES への局在化はカルシウムを必要とする。この現象を利用して、ERES でのカルシウム濃度上昇を担うカルシウムチャネルの探索を進めている。具体的には、小胞体のカルシウム漏洩チャネルとして報告された膜タンパク質を複数選択し、ゲノム編集技術によりそれらがノックアウトされている可能性のある HeLa 細胞を作製した。そして、免疫染色をおこない、ALG-2 及び Sec31A の ERES 局在が減少するかを検討している。ALG-2 をノックアウトした細胞では Sec31A の ERES 局在が消失するが、いくつかの膜タンパク質のノックアウト細胞においても Sec31A の ERES 局在に影響があり、現在、解析を進めている。

calcium imaging, COPII, endoplasmic reticulum

講演番号：3A23p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A23 会場

COP2 結合タンパク質である Sec16B の新機能の解明
Elucidation of novel functions of a COP II-binding protein, Sec16B
○保阪 拓利、小林 俊木、前本 佑樹、伊藤 昭博 (東京薬科大学)
○Takuto HOSAKA, Toshiki KOBAYASHI, Yuki MAEMOTO, Akihiro ITO (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences Univ.)

小胞体は細胞全体に網目状に広がり、タンパク質の輸送や代謝などに関わるオルガネラである。また、小胞体はミトコンドリア、ペルオキシソーム、脂肪滴などの分泌経路以外のオルガネラとも相互作用し、それらの形成、機能に関わることが知られている。COPⅡ小胞は小胞体膜上の小胞体出芽部位(ERES)で形成され、小胞体からゴルジ体への輸送に関わる輸送小胞である。COPⅡ小胞は Sec23-Sec24 複合体 と Sec13-Sec31 複合体に覆われている。Sec16p は酵母で発見された COPⅡ小胞結合タンパク質であり、高等動物では Sec16A と Sec16B が存在する。小胞輸送における Sec16A の機能については良く研究されているが、Sec16B についてはよく分かっていない。

そこでまず、Sec16A と Sec16B に機能的な違いがあるかどうか明らかにするため、結合タンパク質について解析した。Sec16p は Sec13 と結合することが知られていたため、免疫沈降法による Sec13 との結合実験を行ったところ、Sec16A 同様に Sec16B も Sec13 と結合することを見出した。次に、Sec13 との結合が Sec16B の局在へ与える影響を調べるため、GFP 融合 Sec16B を安定発現した HeLa 細胞を作製し、Sec13 を発現抑制した時の Sec16A および GFP-Sec16B の細胞内局在を観察した。コントロール siRNA で処理した細胞では、Sec16A および GFP-Sec16B は ERES 様のドット状に局在を示した。一方、Sec13 発現抑制細胞では、Sec16A はドット状の局在を示したが、GFP-Sec16B は示せなかった。この結果から、Sec16B の ERES 様のドット状の局在は Sec13 が関与していることが示唆された。次に、酵母の Sec16p の Sec13 結合部位を参考にし、308 番目のロイシンをアスパラギン酸に置換した $Sec16B^{L308D}$ 変異体を作成した。$Sec16B^{L308D}$ 変異体は Sec13 と結合せず、細胞内に発現させた $GFP-Sec16B^{L308D}$ は ERES 様の構造に局在しなかった。以上の結果から、Sec16A とは異なり、Sec16B の ERES 様の局在には Sec13 との相互作用が必要であることが示唆された。

Sec16B が小胞輸送に与える影響を調べるため、CRISPER/Cas9 システムにより Sec16B を欠損させたマウス胎児線維芽細胞株 (3T3-L1 細胞)に温度感受性水疱性口内炎ウィルス膜タンパク質(VSV-G ts045-GFP)を安定発現させ、輸送実験を行った。その結果、野生型細胞と比べて Sec16B ノックアウト細胞では VSV-Gts045-GFP の輸送が遅延したことから、Sec16B は COPⅡ小胞の輸送を調節する機能があることが示唆された。現在、Sec16B の ERES への局在が COPⅡ小胞輸送の調節に必要かどうか検討している。加えて、この Sec16B ノックアウト細胞株を用いて、脂肪分化における Sec16B の機能について解析したので合わせて紹介したい。

Membrane transport, Cop2, Lipid droplets

講演番号：3A23p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A23 会場

mTOR シグナルによる SREBP 活性化機序の解析
Role of mTOR signaling in SREBP processing
○山内 祥生[1,2]、古川 鋼一[2,3]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大農、[2]名大医、[3]中部大)
○Yoshio YAMAUCHI[1,2], Koichi FURUKAWA[2,3], Ryuichiro SATO[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Nagoya Univ., [3]Chubu Univ.)

【背景と目的】　Sterol Regulatory Element-Binding Protein（SREBP）は、コレステロール及び脂肪酸合成に関与する多くの酵素遺伝子の発現を制御する転写因子である。SREBP は小胞体に局在する前駆体がそのシャペロンタンパク質として機能する SCAP とともにゴルジ体へ輸送され、2 つのプロテアーゼによって切断されることで活性化される。この活性化のプロセスは厳密に制御されており、前駆体の小胞体からゴルジ体への輸送は小胞体のコレステロールレベルによって制御されている。一方、SREBP は様々な増殖因子刺激によっても活性化される。特に、Akt-mTOR シグナルが SREBP の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかしながら、Akt-mTOR シグナルが SREBP の活性化を制御するメカニズムは十分に理解されていない。本研究では、がん細胞における Akt-mTOR シグナルが SREBP を活性化する分子機序について解析を行った。
【方法と結果】　我々は以前、ヒトメラノーマ細胞においてメラノーマ関連抗原の発現が SREBP の活性化を誘導し、その活性化が Akt-mTOR シグナルによって制御されていることを報告した。本研究では、mTOR 阻害剤や siRNA を用いて mTOR を阻害し、SREBP の切断や小胞体コレステロールに与える影響について検討した。mTOR 阻害剤 Ku-0063794 及び PP242 は、ヒトメラノーマ細胞において SREBP の切断を抑制した。また、mTORC1 の構成因子 Raptor 並びに mTORC2 の構成因子 Rictor のノックダウンも同様に SREBP の切断を阻害した。SREBP の小胞体からゴルジ体への輸送は小胞体コレステロールレベルによって厳密に制御されている。そこで、mTOR シグナルが小胞体コレステロールに与える影響について検討を行った。その結果、成長因子による mTOR の活性化は小胞体コレステロールを減少させ、逆に mTOR 阻害剤は小胞体コレステロールを増加させることが示された。最後に、恒常的活性型 SCAP を発現し、SREBP が恒常的に活性化している変異細胞を用いて、mTOR 阻害剤が SREBP の切断に与える影響を検証した。その結果、この変異細胞では mTOR を阻害しても SREBP の活性化が抑制されにくいことが明らかになった。
【結論】　以上の結果から、mTOR シグナルは小胞体のコレステロールレベルを調節することで小胞体からゴルジ体への SREBP の輸送を制御していることが示唆された。

SREBP, mTOR, cholesterol

発表責任者：山内祥生（a-Yoshio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A23p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A23 会場

内因性酸化コレステロールが SREBP-2 活性に及ぼす影響

Effect of endogenous oxysterol on SREBP-2 activity

○齋藤 穂高、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Hodaka SAITO, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

細胞内コレステロール恒常性は厳密に制御されており、転写因子 SREBP がその中心的な制御因子として機能している。SREBP はステロール及び脂肪酸合成を制御する重要な分子であり、SREBP-2 は主にコレステロール生合成を調節している。コレステロール生合成はコレステロール代謝産物である酸化ステロールによって負のフィードバックを受ける。酸化ステロールの中でも 25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)はコレステロール生合成を最も強力に阻害する。最近、細菌感染やウイルス感染によって、25-HC 産生酵素である Cholesterol 25-Hydroxylase(CH25H)の発現と 25-HC の産生が顕著に亢進する。さらに、この CH25H の亢進がマクロファージや宿主細胞の細菌感染やウイルス感染に対する抵抗性を亢進することも明らかになった．これまで 25-HC の細胞コレステロール代謝に及ぼす影響についての解析は培地中に加えた外因性 25-HC が中心であり、CH25H の発現がコレステロール代謝へ与える影響についての解析は多くない。そこで、本研究では CH25H の強制発現によって産生される内因性 25-HC が SREBP やその制御因子に及ぼす影響について検討した．

【方法と結果】

CH25H によって産生される内因性 25-HC が SREBP-2 標的遺伝子の発現に及ぼす影響についてレポーターアッセイ及び定量 RT-PCR により評価した．SREBP-2 標的遺伝子のスクアレン合成酵素(SQS)及び HMG-CoA 合成酵素(HMGCS)のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドと CH25H 発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、CH25H の発現が両遺伝子のプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。その結果、CH25H 強制発現によって両遺伝子のプロモーター活性の有意な減弱が認められた．さらに、CH25H の発現が HMGCS や HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)、LDL レセプターなど SREBP-2 標的遺伝子の mRNA レベルを減少させることが定量 RT-PCR により確認された。また、CH25H の過剰発現は SREBP-2 のプロセシングを抑制することも確認された。25-HC は SREBP を小胞体に滞留させる因子である Insig1 を安定化し、SREBP-2 の活性化を抑制することが知られているので、その点について検証した。その結果、CH25H の発現によって Insig1 が安定化されることが明らかになった。

【結論】

以上の結果から，CH25H の強制発現によって産生される内因性 25-HC は，外因性 25-HC と同様、Insig1 を安定化し、SREBP-2 の活性化とコレステロール合成関連遺伝子の発現を抑制することが示された。

Cholesterol, 25-Hydroxycholesterol, SREBP

発表責任者：齋藤穂高（adca1066@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A23p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A23 会場

脂質トランスポーターABCA1 とα1-syntrophin およびα-TTP 間の相互作用機構の解析

Interactions of mechanisms between lipid transporter ABCA1 and α1-syntrophin or α-TTP

○梶 友里恵[1,2]、谷口 詩保[2]、藤林 果奈[2]、杉本 直紀[2]、佐伯 和弘[1,2]、田口 善智[1,2]([1]近畿大院 生物理工、[2]近畿大 生物理工 遺伝子)
○ Yurie KAJI[1,2], Shiho TANIGUCHI[2], Kana FUJIBAYASHI[2], Naoki SUGIMOTO[2], Kazuhiro SAEKI[1,2], Yoshitomo TAGUCHI[1,2] ([1]Div. of Gene. Engi., Grad. Sch. of Kindai Univ., [2]Div. of Gene. Engi., Kindai Univ.)

【目的】ABCA1 は、ABC(ATP Binding Cassette)輸送体に属する細胞膜局在タンパク質で、ATP の加水分解に依存して、細胞内のコレステロール等の脂質を細胞内から外へ輸送し、HDL(善玉コレステロール)の形成を促進する。ABCA1 遺伝子の異常は血中の HDL 欠損を引き起こし、末梢に過剰なコレステロールが蓄積して動脈硬化症や冠動脈疾患を引き起こすことから、ABCA1 は脂質異常症を予防あるいは治療する鍵を握る遺伝子・タンパク質の一つとして注目されている。

ABCA1 は細胞膜裏打ちタンパク質α1-syntrophin と相互作用することで細胞膜上での安定性が向上し、半減期が延長される。この相互作用は ABCA1 の C 末端の 3 アミノ酸(SYV)に依存し、この 3 アミノ酸を欠損させると相互作用できなくなる。一方、ABCA1 は、脂溶性の抗酸化物質であるα-トコフェロール(ビタミン E の一種)と特異的に結合するα-TTP と共同することにより、α-トコフェロールを細胞外へ排出できる。

本研究では、ABCA1 の発現および活性の調節機構を解明することを目的として、ABCA1 とα1-syntrophin およびα-TTP との間の相互作用機構の解析を試みた。

【方法】野生型 ABCA1、および細胞膜への局在は正常であるが、ATPase 活性を喪失して基質輸送ができない ABCA1 の変異体(ABCA1-MM)と、α1-syntrophin およびα-TTP が相互作用できるのかを検討した。さらに、ABCA1 の C 末端の 3 アミノ酸(SYV)を追加して C 末端に付加した変異体 ABCA1(ABCA1-SYV×3)を作出、α1-syntrophin との相互作用を検討した。発現ベクターの導入により、ヒト由来の培養細胞(HEK293)に、α1-syntrophin と野生型 ABCA1、ABCA1-MM、または ABCA1-SYV×3 を共発現させた。また、α-TTP と野生型 ABCA1、ABCA1-MM を共発現させた。それぞれのタンパク質間の相互作用を共免疫沈降法により検討した。

【結果・考察】α1-syntrophin は、野生型だけでなく ABCA1-MM とも共免疫沈降した。一方、α-TTP は、野生型 ABCA1 と共免疫沈降されたが、ABCA1-MM とは共沈しなかった。以上の結果から、ABCA1 とα-TTP との相互作用は ATP 加水分解に伴う構造変化の影響を受けるが、α1-syntrophin との相互作用はその影響を受けないことが示唆された。α1-syntrophin と ABCA1-SYV×3 との共免疫沈降の結果についても併せて発表・討論する。

ABC protein, ABCA1, co-immunoprecipitation

発表責任者：田口善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3A23p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A23 会場

脂質トランスポーターABCA1 は膜脂質を動かすことによって細胞遊走を制御する
Lipid transporter ABCA1 modulates cell migration by moving membrane lipids.

○伊藤 志帆[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○Shiho Ito[1], Noriyuki Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS Kyoto Univ.)

細胞膜脂質の分布は細胞内のシグナル伝達に重要な役割を果たし、細胞中の脂質の動きは細胞の増殖や遊走などの制御に大きな影響を与えることが考えられる。脂質トランスポーターATP-Binding Cassette A1（ABCA1）は、細胞中の余剰コレステロールを血液中の脂質アクセプターapoA-I へ排出し善玉コレステロール(HDL)を形成することによって、細胞内コレステロール恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし ABCA1 の機能はそれだけでなく、ABCA1 は脂質ラフトを壊すことや、コレステロールを内葉から外葉へフロップし膜中のコレステロールの不均一な分布を維持することが報告されている。さらに細胞混雑に応答して ABCA1 の発現量が変化することが報告されている。このことから内在的に低発現している ABCA1 は細胞外環境に応答して、細胞膜中あるいは細胞内でコレステロールを動かし、細胞機能を微調整することが考えられる。本研究では細胞遊走に着目して、遊走刺激に対して ABCA1 が与える影響を検討した。

まず、2 種類の shRNA を用いて ABCA1 の発現を抑制した ABCA1KD マウス繊維芽細胞を作製し、これらの細胞を用いて、ABCA1 が細胞遊走に与える影響を調べた。評価にはスクラッチアッセイを用い、コンフルエントになるように細胞を播種したプレートに傷をつけて、傷が埋まった面積を算出することで、遊走能を比較した。血清を添加して細胞内外でのコレステロールの交換が起こる条件で検討したところ、ABCA1 の発現量による遊走能の差はみられなかった。一方で、血清を添加しない条件では ABCA1KD 細胞の遊走能は WT より上昇した。このことから ABCA1 が遊走の制御に関与していることが示唆された。さらに本実験条件では脂質アクセプターである apoA-I が存在していないため、コレステロールの排出は起こらない。つまり ABCA1 が細胞遊走を制御するには細胞内でコレステロールを動かすことが重要であることが示唆された。またこの条件で ABCA1 の発現量を調べたところ、血清がない条件では血清がある条件と比べて ABCA1 の発現量が上昇していた。本大会ではこれらの結果を報告し、細胞が外環境に応答して遊走を変化させるときの ABCA1 の役割について議論したい。

ABCA1, migration, cholesterol

講演番号：3A23p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A23 会場

酸化コレステロール結合タンパク質 Insig1/2 による ATF4 発現亢進機構の解明

The contribution of Insig to ATF4 expression by oxysterol

○渡邉 雄一、三吉 翔子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yuichi WATANABE, Shoko MIYOSHI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景･目的】小胞体膜タンパク質である Insig は酸化コレステロールと結合することで、SREBP 活性制御や HMG-CoA 還元酵素の分解制御を介した脂質代謝調節を担う。Insig には高い相同性を有する二つのアイソフォーム Insig1 と 2 が存在するが、両者の役割分担は不明のままである。近年、酸化コレステロールによりストレス応答性の転写因子 ATF4 を誘導することが報告された。

本研究において、種々の酸化コレステロールのうち特に Insig 結合能の高い酸化コレステロールにおいて ATF4 の発現が亢進する結果を得た。このことから、ATF4 発現制御においても Insig がメディエーターとして機能しているのではないかと考え、Insig 欠損細胞株を用いて、Insig と ATF4 発現制御の関係について解析を行い、Insig1/2 の機能分担メカニズムについて解明を試みた。

【方法】CHO-7(Chinese hamster 卵巣由来)細胞並びに Insig 欠損 CHO-7 株 SRD-15 に、25-Hydroxycholesterol (25HC)をはじめとする酸化コレステロールを 5 μM, 24h 添加し、WB 及び RT-qPCR 法により各種タンパク質及び遺伝子発現解析を行った。また、野生型 Insig1、Insig2 及び N 末端細胞質領域を入れ替えたキメラタンパク質に関してレンチウイルスベクターを用いて SRD-15 に発現させ、ATF4 発現制御における Insig1 と 2 の分子機能の差異並びに制御領域について検証した。

【結果・考察】25HC を含む Insig 結合能の高い 3 種の酸化コレステロールの添加により CHO-7 においては ATF4 タンパク質の発現が亢進した。一方で、Insig 欠損株 SRD-15 における ATF4 タンパク質の発現上昇はわずかであった。Insig 欠損により常時活性型となっていた SREBP2 は、SRD-15 に Insig1 あるいは 2 のいずれかを発現させることにより酸化コレステロールに応答するようになった。この時、25HC 添加による ATF4 タンパク質発現亢進は Insig2 発現により回復していたのに対し、Insig1 発現下における ATF4 タンパク質発現上昇はわずかであった。Insig1 と 2 二つのアミノ酸配列アラインメントの結果、両者の配列は N 末端細胞質領域が大きく異なっている。そこで、両者の N 末端領域を入れ替えたキメラタンパク質を SRD-15 に発現させた結果、Insig1 の N 末端細胞質領域を Insig2 のものと入れ替えたキメラタンパク質の発現により ATF4 の発現亢進が回復した。これらの結果から、25HC に対する応答性に Insig1/2 で差異が認められた。さらに、その機能差は Insig の N 末端細胞質領域が担っていることが示唆された。

Insig, oxysterol, stress response

講演番号：3A23p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A23 会場

SREBP/SCAP 相互作用を介する新規脂質合成制御因子の探索

A search for novel factor of lipogenic regulation via SREBP/SCAP interaction.

○丸山 貴史、官 彦州、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Takashi MARUYAMA, Yen-Chou KUAN, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

肥満症は、Ⅱ型糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病の原因になりうる。また、これらの疾患と共に内臓脂肪型の肥満を併発した状態をメタボリックシンドロームとよび、循環器疾患の発症リスクが 30 倍以上に跳ね上がるといわれている。

脂質の代謝を転写レベルで調節しているのが Sterol regulatory element-binding proteins(SREBP)である。SREBP は小胞体膜上で前駆体として合成され、プロセシングを受けて活性型フォームになり、転写因子として機能する。SREBP cleavage-activating protein (SCAP)は主に小胞体膜上に局在している 8 回膜貫通タンパク質である。SREBP のプロセシングを制御しており、C 末端側に存在する WDrepeat が SREBP の C 末端と結合し、複合体が形成された後、ゴルジ体に移送され SREBP はプロセシングを受ける。

SCAP/SREBP はそれぞれの C 末端で相互作用しているが詳細な分子機構は不鮮明な部分も多く、SREBP1 と SREBP2 が異なったプロセシング制御を受けている可能性も考えられる。当研究室では過去に相互作用が SCAP の WDrepeat 内に存在する少なくとも 8 つのアミノ酸残基上で形成されていることを明らかにしている（日本農芸化学会 2017 官彦州）。本研究において SREBP 上の重要な結合部位の探索を行った。SCAP-SREBP の相互作用の詳細な分子機構を解明し、SREBP の活性化を制御し脂質の代謝改善を目的としている。

【方法】

Flag タグを付加した SCAP の発現ベクターと RGSHis タグを付加した SREBP1 の C 末端細胞質領域を含む様々なデリーションコンストラクト発現ベクターを構築し、HEK293T 細胞にトランスフェクションした後、抗 Flag 抗体を用いて共免疫沈降を行った。抗 RGSHis 抗体を用いたウェスタンブロットで検出し、SCAP と SREBP1 デリーションコンストラクトの結合能を試験した。

【結果・考察】

抗 Flag 抗体を用いた共免疫沈降サンプルから検出された SREBP1 デリーションコンストラクトは、SREBP2 と相同性が非常に高い領域（130 アミノ酸残基の配列）を含んでいることが見いだされた。つまり、SREBP1 と SREBP2 は C 末端領域の共通部分で SCAP が結合していると推測された。今後さらに詳細な結合部位などを解析していく方針である。一方で、SREBP-1 と-2 で相同性の低い領域もあり、これらの領域の相互作用に対する影響も見ていく必要がある。

Protein-Protein Interaction, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP), SREBP cleavage-activating protein (SCAP)

発表責任者：丸山貴史（maruyama-takashi-38c@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A23p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A23 会場

超音波処理を用いた接着斑単離法の確立
Establishment of the focal adhesion isolation method by sonication
○柴原 正和[1]、箕浦 広大[2]、市川 尚文[2]、木村 泰久[2]、植田 和光[2,3]、木岡 紀幸[2]([1]京大農、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS)
○Masakazu SHIBAHARA[1], Kodai MINOURA[2], Takafumi ICHIKAWA[2], Yasuhisa KIMURA[2], Kazumitu UEDA[2,3], Noriyuki KIOKA[2] ([1]Dept. of Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】
哺乳類の細胞は生体内でコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス(ECM)に囲まれて存在しており、ECM の種類や硬さといった性質は細胞の分化や遊走といった運命決定に深く関与している。細胞-ECM 間接着部位には、接着斑などの接着装置が形成されている。接着斑は ECM 受容体インテグリンやシグナル分子を含むタンパク質や脂質の超複合体であり、ECM の性質を感知し、その情報を細胞内部に伝達する働きを持っている。接着斑のこれらの働きを明らかにするためには、細胞から接着斑を単離し、そのタンパク質組成を明らかにすることが有効であると考えられる。接着斑の単離法としては、水流を用いた単離法(Jean-Cheng Kuo et al., 2011)が報告されており、当研究室でもこの手法を用いて研究を行っている。しかし、この手法は実験精度に個人差が大きく、また多くの労力を要する。これらの問題を解決するために超音波処理による接着斑の単離法の開発を目的とした。
【方法・結果】
超音波処理による接着斑の単離法は以下の操作によって行った。まず、ECM コートしたプレート上にマウス胎児繊維芽細胞を播種し接着させ、低張液処理を行った。その後、超音波処理により、細胞から細胞質、細胞膜、細胞小器官を除去することで、接着斑のみを残し単離した。また、プレート全体が均一に超音波処理されるように、縦横に 3×3 の合計 9 カ所に移動できる専用の可動型ステージを作製し用いた。1 カ所あたり平均 33J/s で各 1 秒間の超音波処理を 9 回行ったところ、未処理細胞に比べ 1/25 倍程度のタンパク質が回収出来た。また、接着斑の単離の検証は、ウエスタンブロッティングと免疫染色によって行った。ウエスタンブロッティングの結果、超音波処理したサンプルから細胞質タンパク質の ERK2 と Akt、細胞膜タンパク質のトランスフェリン受容体、ゴルジ体タンパク質の GM130 のシグナルが消失していたが、接着斑タンパク質のリン酸化パキシリンのシグナルは残っていた。また、免疫染色の結果、超音波処理したサンプルから ERK2 と Akt、GM130、細胞膜タンパク質の Na/K ATPase、ミトコンドリアタンパク質の MTCO1、ER マーカーの KDEL が除去されていたが、接着斑タンパク質のビンキュリンは残っていた。このことから、超音波処理法により、接着斑が濃縮、単離できていることが分かった。今後この技術とプロテオーム解析を組み合わせて用いることで、ECM の硬さの変化が接着斑タンパク質組成にどのような変化をもたらすかを明らかにしていく予定である。

Focal Adhesion, ECM, Proteome

発表責任者：柴原　正和（smasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A24a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A24 会場

血液凝固因子トロンビンのメダカにおける類似遺伝子産物の発現解析

Biochemical characterization of medaka orthologue for coagulation factor thrombin

○鈴木 里沙[1,2]、渡邊 優子[2]、奥谷 冬穂[2]、辰川 英樹[1,2]、橋本 寿史[3]、人見 清隆[1,2]([1]名大農、[2]名大院創薬科学、[3]名大生物機能開発利用セ)
○Risa Suzuki[1,2], Yuko Watanabe[2], Kazuho Okuya[2], Hideki Tatsukawa[1,2], Hisashi Hashimoto[3], Kiyotaka Hitomi[1,2] ([1]School of Agricultural Science Nagoya Univ., [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya Univ., [3]Bioscience and Biotechnology Center, Nagoya Univ.)

【背景・目的】脊椎動物での傷害時に出血から血液凝固に至る過程は、多数の酵素反応からなる複雑なカスケードによって達成される。最終的にはフィブリノーゲンがフィブリンへと限定分解を受けると同時に、活性化された血液凝固第十三因子（トランスグルタミナーゼ、Factor XIII）による酵素的な架橋重合化によって、不溶化されたフィブリンが「かさぶた」として成立する。トロンビンは、フィブリノーゲンや Factor XIII を限定分解により生成・活性化させる。また血小板刺激などの機能を有することも知られている。

我々はこれまで、モデル生物として有用な魚類、ニホンメダカ（*Oryzias latipes*）を用いて、Factor XIII の存在様式を明らかにし、その遺伝子変異メダカも確立してきた。本研究では、この上流で活性化を支配する、トロンビンのメダカでの相当する類似遺伝子（オルソログ）の存在を調べ、メダカ組織内での発現様式や、生化学的性質について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】メダカの cDNA データベース(NBRP: 基礎生物学研究所ナショナルバイオリソースプロジェクト)を対象として、マウスのトロンビン遺伝子配列を基にして類似遺伝子配列を検索した。その結果、類似する遺伝子を 1 種類見出し、cDNA クローンを入手した。全アミノ酸配列を推測したところ、哺乳類トロンビンに確認されている活性部位、Gla ドメイン（ビタミン K 依存的カルボキシル化グルタミンを含みリン脂質膜結合に必要)、Kringle ドメイン（S-S 結合の安定的形成に必須）を含めて相同性が保たれていた。

そこで cDNA を大腸菌(BL21 株)用の発現ベクターに組み込んで、ヒスチジンタグ付きでの組換えタンパク質として発現を試みた。37 度での培養温度では不溶性になったものの、20 度に下げることでほぼ可溶性画分に移行した。これらを精製し、抗原としてポリクローナル抗体を作製し、可溶性画分の組換えタンパク質を用いて抗体精製を行った。抗体を用いて、メダカ組織抽出物に対するイムノブロッティング、並びに組織切片での発現パターンを解析した。その結果、血液（血漿）中では主に前駆体レベルで発現が見られ、他組織でも発現を確認した。固定した全組織での染色では、加えて筋肉においても発現が見られた。現在、限定分解された場合の活性化の性状についても検討している。

Horimizu et al. FEBS J. (2017)

blood coagulation, thrombin, Oryzias latipes

講演番号：3A24a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A24 会場

ヒト表皮細胞分化に伴うタンパク質架橋酵素の発現変動と基質探索

Expression analysis and substrate identification of skin transglutaminases in human keratinocytes

○加藤 まなみ[1,2]、田辺 勇輝[2]、辰川 英樹[1,2]、人見 清隆[1,2]([1]名大農、[2]名大院創薬科学)
○Manami KATO[1,2], Yuki TANABE[2], Hideki TATSUKAWA[1,2], Kiyotaka HITOMI[1,2] ([1]School of Agricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya Univ.)

【背景・目的】タンパク質架橋酵素（トランスグルタミナーゼ：以下 TGase と略記）は、基質となるタンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に、カルシウムイオン依存的にイソペプチド結合形成（架橋）を触媒する酵素ファミリーである。ヒトを含めて哺乳類では酵素ファミリーとして 8 種類(Factor XIII, TG1～TG7)のアイソザイムが異なる組織分布で発現し、多彩な生命現象に関わっている。このうち皮膚表皮の形成においては、TG1 と TG3 とが主要なアイソザイムとして表皮細胞の構造タンパク質を架橋重合することで表皮の硬度化に貢献している。この時、表皮では分化増殖によって未分化な表皮幹細胞から角化細胞の形成が行われるが、分化に伴って TGase が発現・活性化して、特定の基質タンパク質を架橋化して重合化させ、バリア機能を担う高分子複合体(cornified envelop)を形成する。しかし、TGase の詳細な発現パターンや、架橋される基質群の実態解明はいまだ達成されていない。本研究では最終分化（角化形成）を模倣できるヒト表皮細胞の立体培養系を用いて、分化に伴う TGase の活性変動、分化時に架橋される基質の探索を目的とした。
【方法・結果】表皮細胞の立体培養は、平面培養において増殖させた細胞を、支持体上で生育させ分化させる培養システム（Cellntech 社：分化用培地および空気暴露操作）中で行った。このシステムは分化開始後に約 14 日間で細胞が層状になって最外層の細胞は角化することができる。

分化開始後の日数に応じて細胞から抽出液を調製し、抗体による TGase の発現誘導のレベルと活性の変動を検討した。酵素活性評価および基質探索は、これまで我々が確立しているアイソザイム特異的な基質ペプチドを用いて評価した。このペプチド（配列）はグルタミン残基側の高反応性な基質として働き、酵素活性依存的に基質タンパク質のリジン残基に結合する。

ビオチン標識した基質ペプチドを抽出液中と混合し、架橋反応でペプチドを取り込んだリジン提供側の基質を、ウェスタンブロッティングとアビジン過酸化酵素で検出した。その結果、TG1, TG3 の分化日数による活性変動を明らかにした。

さらに、基質ペプチドを用いた分化途上にある表皮細胞中の基質探索を行った。細胞抽出液と基質ペプチドを反応後、アビジンゲルに結合するタンパク質を精製した。電気泳動を行い、特異的に基質と考えられるバンドを対象に質量分析を行って同定した。その結果、表皮細胞に特異的な既知のタンパク質に加え、いくつかの既存タンパク質が基質である可能性が示された。

Yamane et al. BBRC (2016)

transglutaminase, skin, epidermis

講演番号：3A24a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A24 会場

ABCA1 による HDL 産生活性は細胞膜コレステロール濃度に依存している
HDL generation by ABCA1 is dependent on cholesterol concentration in the plasma membrane

○小笠原 史彦[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命科学、[2]京大・iCeMS）
○Fumihiko OGASAWARA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Dept. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

[背景・目的]

ATP Binding Cassette A1（ABCA1)は、血中の脂質受容体であるアポ A-I に脂質を排出し、善玉コレステロールと呼ばれる high-density lipoprotein（HDL）を産生する脂質輸送体である。HDL を介したコレステロールの排出は、末梢で余剰になったコレステロールを除去する唯一の経路であるため、動脈硬化の予防に大きく貢献する。ABCA1 による HDL 産生は培養細胞を用いた測定系によって検出可能であり、HDL 産生と ABCA1 の発現の因果関係は証明されている。しかし、HDL 産生における ABCA1 の機能に関しては議論が分かれており、いまだ解明されていない。これは、脂質の受動拡散や細胞内輸送等の影響により、明確な結果を得ることが難しかったためである。そこで本研究では、ABCA1 の輸送基質であるコレステロールを細胞膜に直接添加し、短時間で HDL 産生を測定することにより、それらの影響を最小限に抑えることで細胞膜上の ABCA1 の HDL 産生活性を評価することを目指した。

[方法・結果]

まず、細胞膜中のコレステロール濃度を一過的に上昇させるため、ABCA1 発現細胞にメチル-β-シクロデキストリン/コレステロール複合体を添加した。その後、アポ A-I を添加し脂質を排出させると、コレステロールを添加していない細胞と比較して脂質排出量が数倍増加した。ABCA1 の産生する HDL は主にホスファチジルコリンおよびコレステロールを含むが、上記実験ではコレステロールのみならずホスファチジルコリンの排出量も増加していた。また、ABCA1 と最も相同性が高く、ABCA1 と同様に HDL 産生活性を持つが、コレステロールを輸送しない ABCA7 についても同様の実験を行ったところ、コレステロール添加による脂質排出量の増加は見られなかった。これらの結果から、ABCA1 による HDL 産生量が細胞膜中のコレステロール濃度に依存して変化することが示唆された。ABCA1 は代謝回転の速い膜タンパク質であり、細胞の状態に応じて細胞膜への局在率も変化させることが知られている。コレステロール添加がそれらに影響を与えた可能性を考慮し、ABCA1 の発現および局在を調べたが、コレステロール添加の有無による大きな変化は見られなかった。この結果は、細胞膜コレステロール濃度が ABCA1 の発現や局在ではなく、HDL 産生活性に影響を与えていることを示している。

ABCA1, cholesterol, HDL

講演番号：3A24a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A24 会場

キメラタンパク質を用いた ABCA サブファミリータンパク質の C 末端領域の機能解析
Functional analysis of the C-terminal domain of ABCA subfamily proteins by using ABCA1 chimera proteins.

○岡本 雄介[1]、永田 紘[2]、笠井 倫志[3]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1,2]、植田 和光[1,2]([1]京大院・農、[2]京大 iCeMS、[3]京大ウイルス・再生医科学研究所)
○Yusuke OKAMOTO[1], Koh NAGATA[2], Rinshi KASAI[3], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1,2], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ., [3]Inst. for Frontier Med. Sci., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)は，善玉コレステロール(HDL)の産生に不可欠の膜タンパク質である．ABCA1 は細胞内に過剰に蓄積したコレステロールを，ホスファチジルコリン(PC)などのリン脂質とともに細胞外の脂質受容体である apoA-I に受け渡して HDL を産生する．これまでに私たちは，ABCA1 が HDL 産生時に細胞膜上で一時的に二量体化し，静止することを報告したが，ABCA1 による HDL 産生機構の詳細は完全には明らかとなっていない．全ての ABCA サブファミリータンパク質は 100 前後のアミノ酸残基からなる特徴的な C 末端領域を持つ．この領域内のいくつかのモチーフは ABCA1 の機能に重要であることが報告されているが，その詳細な役割は不明である．また，ABCA1 以外の ABCA サブファミリータンパク質でも類似のモチーフがある程度保存されているが，これらのタンパク質の機能におけるこうしたモチーフの重要性はほとんど報告されていない．本研究では，ABCA1 の C 末端領域を，他の ABCA サブファミリータンパク質の C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質の機能を解析することで，ABCA サブファミリーの C 末端領域の役割を明らかにすることを目指した．

【方法・結果】

ABCA1 の C 末端領域を，他の 11 種の ABCA サブファミリータンパク質の C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質を作成した．これらのキメラタンパク質について，apoA-I 依存的なコレステロールと PC の排出活性を調べると，ABCA2，ABCA3，ABCA4，ABCA12，ABCA13 とのキメラタンパク質は脂質排出活性を保持しており，これらの C 末端領域が ABCA1 の C 末端領域の機能を代替できることが明らかとなった．また，全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いた一分子イメージングによってキメラタンパク質の細胞膜上での挙動を解析した結果，脂質排出活性を保持した ABCA4 や ABCA13 とのキメラタンパク質は，野生型の ABCA1 と同様に細胞膜上で静止する傾向にあった．ABCA2，ABCA3，ABCA4，ABCA12，ABCA13 の C 末端領域は，ABCA1 の C 末端領域と同様の機能を持っていたことから，これらの ABCA サブファミリータンパク質においても，C 末端領域が機能や膜上での挙動(二量体化や静止)に関わっている可能性が示唆された．ABCA2 と ABCA13 は，それぞれアルツハイマー病と統合失調症との遺伝的な関わりが示唆されているものの，その分子機構は明らかとなっていない．本研究の結果から，脂質を輸送基質とする ABCA1 や ABCA3，ABCA4，ABCA12 と同様に，ABCA2 や ABCA13 も脂質を輸送基質とする可能性が示唆された．

ABC proteins, HDL, single molecule imaging

発表責任者：植田　和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A24a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A24 会場

リン脂質輸送体 ABCB4 の基質取り込みゲートの解析

Functional analysis of substrate entry gate of phospholipid transporter ABCB4

○小川 峻[1]、末永 健人[1]、木岡 紀幸[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]([1]京大農応生、[2]京大 iCeMS)
○ Shun OGAWA[1], Kento SUENAGA[1], Noriyuki KIOKA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS., Kyoto Univ.)

<背景>ATP-Binding Cassette(ABC)B4 は胆管細胞の胆管側細胞膜に発現する ATP 依存的な 12 回膜貫通型輸送体である。ABCB4 は膜中のホスファチジルコリン(PC)やコレステロールを胆汁中に排出し、胆汁酸の界面活性作用を弱めることで胆管細胞を保護する。ABCB4 は多剤排出ポンプ ABCB1(MDR1)と 86%のアミノ酸配列類似性を示すため、両者の基質輸送機構には共通点が多いと推測される。MDR1 の好熱性紅藻ホモログの CmABCB1 の構造解析(1)から、MDR1 では第 4 膜貫通ヘリックス(TM4)と第 10 膜貫通ヘリックス(TM10)の一部が柔軟に動き、脂質膜中から基質を取り込んでいる可能性が示唆された。実際、ヒト MDR1 の TM4 と TM10 の柔軟な領域の連続する 3 アミノ酸をバリンに置換した変異体は、ヘリックスの柔軟性の低下により基質輸送能を失うことが先行研究により示唆された。そこで本研究では同様の基質取り込み機構が ABCB4 にも存在するかを検討した。さらに、高い類似性を示す ABCB4 と MDR1 の機能の違いがどのように生じているのか、基質取り込み経路に注目して検討を行った。
<結果>ヒト ABCB4 の TM4 と TM10 の連続する 3 アミノ酸をバリンに置換した変異体を作成した。また、発現量や細胞内局在を評価するため C 末端に EGFP を付加した。野生型および変異体を HEK293 細胞に一過的に発現させ、EGFP 蛍光の観察を行ったところ、バリン置換は ABCB4 の細胞膜への局在や発現量に影響を与えないことが分かった。胆汁酸成分であるタウロコール酸への ABCB4 バリン置換体の PC 排出活性を測定した結果、TM4 バリン置換体は PC 排出活性をもたない一方で、TM10 バリン置換体は野生型の約 50%の排出活性を保持していることが明らかとなった。また、隣接するヘリックスとのイオン結合による TM4 の固定化を行った結果、バリン置換と同様に PC 排出活性が失われた。これらの TM 固定化変異体についてタウロコール酸へのコレステロール排出活性を測定したところ、PC 排出活性と同様の傾向を示した。これらの結果から、ABCB4 の TM4 の柔軟な領域は PC とコレステロールが入り込むゲートとして機能していることが示唆された。ABCB4 と MDR1 の TM4 の保存性は非常に高く、なぜ MDR1 が PC やコレステロールを排出できないのかが新たな疑問として浮上した。そこで、TM4 が柔軟に動くことによって膜中に露出する別の部分が基質の選別に関わるのではないかと考え、ABCB4 の TM4 と隣接する第 5 膜貫通ヘリックス(TM5)の膜貫通領域を MDR1 のアミノ酸配列と入れ替えたキメラ変異体を作成した。このキメラ変異体は PC 排出活性を失っていた。このことから ABCB4 および MDR1 の基質の選別において、TM5 が重要な役割を持つことが示唆された。

(1) Kodan A, PNAS 111, 4049-54, 2014

ABC transporter, ABCB4, MDR1

講演番号：3A24a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A24 会場

ヒト多剤排出ポンプ MDR1(ABCB1)の構造変化において ATP が果たす役割の検討

The role of ATP in the conformational changes of human multidrug transporter MDR1(ABCB1)

○二股 良太[1]、小笠原 史彦[1]、市川 尚文[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農、[2]京大・iCeMS)
○ RYOTA FUTAMATA[1], FUMIHIKO OGASAWARA[1], TAKAFUMI ICHIKAWA[1], YASUHISA KIMURA[1], NORIYUKI KIOKA[1], KAZUMITSU UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】

多剤排出ポンプ MDR1(ABCB1)は、脳の毛細血管、小腸の細胞膜上などで生体異物を ATP 加水分解に依存して細胞外へ排出する。また、抗がん剤に対する多剤耐性の獲得に関与しているため、がん治療の標的分子として重要である。MDR1 は膜貫通領域(TMD)2 個と細胞質側の ATP 結合領域(NBD)2 個が TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 の順に並んだ構造を持つ。MDR1 は 2 つの NBD が離れて細胞質側に開いた内向き構造と NBD が二量体化して細胞外側に開いた外向き構造を持ち、ATP 加水分解依存的にこれらを交互に繰り返すことで基質を輸送すると考えられている。しかし、これまでに MDR1 のダイナミックな構造変化を生細胞を用いて評価した報告は無く、構造変化の際に ATP 結合および加水分解が果たす役割の詳細は明らかになっていない。これまでの研究で、MDR1 の 2 つの NBD の後ろに 2 種類の蛍光タンパク質を融合した Two-color MDR1 を作製し、分子内蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって NBD の距離の変化を検出することで、生細胞において MDR1 の構造変化を評価できる系を確立している。そこで、この実験系を用いて ATP 結合および加水分解の役割を解明することを目指した。

【方法・結果】

MDR1 では ATP 結合ができない変異体(K433M/K1076M)および ATP 結合はできるが加水分解ができない変異体(E556Q/E1201Q)が知られている。Two-color MDR1 にこれらの変異を導入し、ヒト胎児腎臓由来細胞に一過的に発現させて、共焦点蛍光顕微鏡を用いて FRET シグナルを測定し、細胞膜上に局在する MDR1 の FRET 効率を画像解析により算出した。その結果、ATP 結合ができない変異体は輸送基質を添加しても FRET 効率が上昇せず、2 つの NBD が離れた構造で停止していることが示唆された。また、ATP 加水分解ができない変異体は輸送基質が存在していなくても高い FRET 効率を示すことから、2 つの NBD が近接した構造で停止していることが示唆された。さらに、ストレプトリジン O で細胞膜に穴を開けて細胞内の ATP を枯渇させた条件において、野生型 Two-color MDR1 の構造変化を調べた。その結果、ATP 結合ができない変異体と同様に、基質を添加しても FRET 効率が上昇せず、内向き構造で停止していることが示唆された。これらの結果から、MDR1 は ATP 結合が内向き構造から外向き構造への変化を、ATP 加水分解が外向き構造から内向き構造への変化を誘起することが示唆された。

ABC protein, MDR1, intramolecular FRET

講演番号：3A24a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A24 会場

光反応性ホスファチジルコリンを用いた脂質抱合型 apoA-I の標識手法の確立
Photo-labeling of lipid-loaded human apoA-I with photoreactive phosphatidylcholine
○藤本 和希[1]、木村 泰久[1]、安部 真人[1]、三芳 秀人[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・物質-細胞統合システム拠点)
○ KAZUKI FUJIMOTO[1], YASUHISA KIMURA[1], MASATO ABE[1], HIDETO MIYOSHI[1], KAZUMITSU UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMs)

＜背景・目的＞
高密度リポタンパク質（HDL）は末梢から肝臓へとコレステロールを輸送する唯一の経路であり、血中濃度や産生能力が動脈硬化と負に相関することから善玉コレステロールとしても知られている。HDL は血中のアポリポタンパク質 A-I（apoA-I）に脂質輸送体である ABCA1 がコレステロールと脂質を輸送することで形成が開始される。電子顕微鏡観察や apoA-I の二次構造から、初期 HDL は 200 分子程度のリン脂質やコレステロールを 2 分子の apoA-I が取り囲んだディスク状の構造をしており、apoA-I の両親媒性 α-ヘリックスが疎水性面を内側に向けて脂質に巻き付いていると考えられている。しかし、apoA-I の α-ヘリックスの疎水性面と脂質の相互作用を直接示した研究は未だない。本研究では光反応性ホスファチジルコリン（光反応性 PC）を用いて apoA-I の脂質相互作用部位を同定する手法を確立することを目的とした。
＜方法＞
本研究で用いた光反応性 PC はアシル鎖に光反応用のジアジリン環と検出用のアルキンを持つ。光反応性 PC は UV 照射によって近傍のアミノ酸と共有結合を形成するため、標的タンパク質の酵素消化と質量分析により、結合部位をアミノ酸レベルで同定することが可能である。
＜結果＞
N 末端に His タグを融合したヒト apoA-I を、Freestyle293 細胞を用いて過剰発現させ、Ni アフィニティー担体を用いて精製した。続いて精製した apoA-I と、光反応性 PC を含むリン脂質リポソームを混合し、試験管内で初期 HDL を再構成した。再構成 HDL をサイズ排除クロマトグラフィーにより分画し、UV 照射後、SDS-PAGE によって 1 分子の apoA-I に対する光反応性 PC の結合量を分子量の変化から算出した。光反応性 PC のみからなるリポソームを用いて再構成 HDL を作成すると、13 分子程度の光反応性 PC が apoA-I に結合した。一方、5%の割合で光反応性 PC を混合した DOPC リポソームを用いて再構成 HDL を作成した場合には、1 分子の apoA-I に結合する光反応性 PC 量は 1-3 分子程度であった。この結果から、再構成に用いる光反応性 PC の濃度によって apoA-I への結合量を変化させられることが明らかとなった。本手法は PC 結合性タンパク質の直接結合部位を検討でき、様々なタンパク質に応用可能であると期待できる。

apolipoprotein A-I, high density lipoprotein, photoreactive phosphatidylcholine

講演番号：3A24a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A24 会場

Phos-tag SDS-PAGE を用いた N-ミリストイル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解析

Analysis of protein N-myristoylation dependent protein phosphorylation reaction by Phos-tag SDS-PAGE

○谷川 綾音[1]、木下 恵美子[2]、黄波戸 亜哉[1]、守屋 康子[1]、木下 英司[2]、小池 透[2]、内海 俊彦[1]([1]山口大院・創成科、[2]広島大院・医歯薬保)
○Ayane TANIKAWA[1], Emiko KINOSHITA[2], Aya KIWADO[1], Koko MORIYA[1], Eiji KINOSHITA[2], Tohru KOIKE[2], Toshihiko UTSUMI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】タンパク質 N-ミリストイル化は主として可溶性の細胞質タンパク質に生じ、膜への局在性を付与することにより、細胞情報伝達タンパク質の機能発現に寄与している。この N-ミリストイル化が、リン酸化反応の基質タンパク質に膜局在性を付与し、膜上でのリン酸化反応を生じさせることが知られている。しかし N-ミリストイル化を介したタンパク質リン酸化反応の簡便な検出法は確立されていない。本研究では、N-ミリストイル化を介した膜局在化に伴い、膜上で活性化した PKC-αにより特異的リン酸化反応を生じることが知られている FMNL2 をモデルタンパク質として用いて、Phos-tag SDS-PAGE を用いた N-ミリストイル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解析系の確立を行った。
【方法・結果】FMNL2 の C 末端に FLAG-tag を付加した野生型(WT)cDNA、および N-ミリストイル化を阻害した変異体(G2A 変異体)cDNA を作成した。これらの cDNA を COS-1 細胞あるいは HEK293 細胞に遺伝子導入し、標識-ミリスチン酸を用いた代謝標識実験により、N-ミリストイル化を、免疫蛍光染色法により細胞内局在を検討した。また、リン酸化は、遺伝子導入細胞の溶解液を Zn^{2+}-Phos-tag SDS-PAGE に供与し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにおけるバンドのシフトにより検討した。またリン酸化部位の同定は、既知リン酸化部位のデータベースである PhosphoSitePlus の情報を基に、リン酸化部位の Ala 変異体を作成し Phos-tag SDS-PAGE での移動度の変化により同定した。その結果、WT の FMNL2-FLAG は効率よく N-ミリストイル化され、主として原形質膜に局在したのに対し、FMNL2-G2A-FLAG は N-ミリストイル化されず細胞質に局在した。WT と G2A 変異体のリン酸化を Phos-tag SDS-PAGE により比較した結果、WT では G2A 変異体に生じないリン酸化部位が２カ所存在し、このうちの１カ所は、これまでに PKC-αによりリン酸化が生ずる事が報告されている 1072 位の Ser 残基であることが明らかになった。また他の１カ所は、これまでに生理的な機能が報告されていない新たなリン酸化部位であった。以上の結果から、WT と G2A 変異体を遺伝子導入した細胞溶解液を Phos-tag SDS-PAGE で解析することにより N-ミリストイル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解析が可能であることが明らかになった。

N-myristoylation, phosphorylation, Phos-tag SDS-PAGE

講演番号：3A24a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A24 会場

精製タグや IPTG 誘導を利用しない熱不安定な蛋白質の調製
Expression and purification of thermodynamically unstable proteins without either IPTG induction or affinity tags.
○小林 誠[1]、西川 勇樹[1]、田中 真帆[1]、恩田 真紀[2]([1]大阪府大・生命環境・自然科学、[2]大阪府大院・理・生物)
○Makoto Kobayashi[1], Yuki Nishikawa[1], Maho Tanaka[1], Maki Onda[2] ([1]Coll. of Life, Environ., and Adv. Sci.,Sch of Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景】PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)は、プラスミン活性化因子 tPA, uPA と結合して不可逆的に失活させる蛋白質で、これを阻害すると血栓の溶解や組織の線維化抑制に繋がることから、血栓症関連疾患の治療薬開発におけるターゲット分子の1つとして大変注目を集めている。 PAI-1 の Native 構造はエネルギー的に不安定で、生成後、最安定で不活性な Latent 型へ自発的に構造転移する(37℃での半減期は約 2 時間)。 このため、37℃での半減期を 147 時間に延ばした変異体(PAI-1_{am}：N150H/K154T/Q319L/M354I)が研究では頻繁に代替利用されているが、比較的短時間で調製できる大腸菌を用いても、培養・精製の過程を経て相当量の Latent 型 PAI-1_{am} が生じる。 また、PAI-1 はセリンプロテアーゼを強力に阻害するため、トロンビン等で精製タグを切断する発現系が利用できない。 今回、精製タグや IPTG 誘導を利用しない大腸菌発現系により、Latent 型をほとんど含まない PAI-1_{am} 及び不安定な PAI-1 変異体 W139Y の調製に成功したので報告する。

【実験方法と結果】pET28b の *NcoI– BamHI* 切断サイト間に PAI-1_{am} または W139Y の cDNA を挿入した発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、精製タグを有しない目的蛋白質を得た。 様々な培養条件を検討した結果、IPTG を添加せずに 22℃で 24 時間培養することで、上清画分から PAI-1_{am} 及び W139Y を得ることができた。 得られた上清を 40%／65%硫安で分画した後、PAI-1 の分子表面に多くの His 側鎖が露出していることに着目し、Ni-NTA アガロースによる精製を試みた。その結果、狙い通りのアフィニティ吸着が見られ、その後、陽イオン交換クロマトグラフィを行うことで単離に成功した。しかし、硫安分画による選別が不十分であった事や収量が少なかった点を考慮し、Ni-アフィニティ精製→硫安分画→陽イオン交換クロマトグラフィと、順序を変更して精製を行った。その結果、目的蛋白質の収量は前述の手法と比べて 12 倍となった(9.3 mg/1 L culture)。得られた蛋白質の活性を tPA との複合体形成能で調べたところ、不活性な Latent 型はほとんど含まれておらず、高純度の Native 型が得られた。

【結言】本手法は、37℃で不安定化する蛋白質、精製タグの切断が困難またはタグ切断の段階で収量が大きく下がる蛋白質の調製に有用である。

PAI-1, affinity chromatography purification, non-tagged protein serpin

発表責任者：恩田　真紀（onda@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A24a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A24 会場

アミロイドプラーク分解促進薬開発を目的とした tPA プロテアーゼドメインの調製

Preparation of the protease domain of tPA for development of drugs to promote the degradation of amyloid plaques

○津田 美代子[1]、原田 彰大[2]、加藤 美有[2]、恩田 真紀[1]([1]大阪府大院・理・生物、[2]大阪府大・生命環境・自然科学)
○Miyoko TSUDA[1], Akihiro HARADA[2], Miu KATO[2], Maki ONDA[1] ([1]Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Coll. of Life, Environ., and Adv. Sci.,Sch of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【研究の背景と目的】組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）は、フィブリンに結合した状態でプラスミン（血栓を溶解する酵素）を活性化することから、血栓を特異的に溶解できる薬剤として、脳梗塞の治療等に臨床利用されている。近年、プラスミンはアミロイドプラークを分解することで注目されているが、従来の tPA 製剤では出血性合併症が起こるため、長期使用は現実的ではない。そこで、フィブリン結合部位を除去したプロテアーゼドメインのみを、短時間・低コストで生産できる大腸菌を使って、大量調製する系の確立を試みた。

【実験方法】tPA プロテアーゼドメイン（Ile276-Pro527）の cDNA を、C 末に 6×His-tag を付加するプラスミド *pET21d* に組み込んだ。これに、Cys395（天然型ではフィブリンと結合する kringle 2 ドメインと S-S 架橋を形成している）を Ala に置換する変異を導入し、*Rosetta-gami B (DE3)*を宿主にして目的蛋白質を発現させた。条件次第では可溶性画分から tPA を得ることは可能であったが、収量が少なく､且つ S-S 異性体が多く混在したため､不溶性画分から refolding により調製する手法に切り替えた。まず、封入体を界面活性剤で洗浄した後、6 M グアニジン塩酸塩で可溶化し、これを 8 M 尿素の変性条件下で Ni アフィニティクロマトグラフィにより精製した。得られた精製変性蛋白質を DTT で還元し、pH ジャンプを経た後、酸化型グルタチオンを添加して、本蛋白質が有する 10 個の Cys をグルタチオンでブロックした。この mixed S-S 蛋白質を、0.4 M Arg, 0.05% tween 80, 2 mM 還元型グルタチオンを含む refolding buffer に 1 滴ずつ滴下した後、24 時間かけて refolding させた。得られた試料を Ni-NTA アガロースで濃縮した後、陰イオンクロマトグラフィで精製した。

【結果】通常、tPA の精製では利用されない陰イオンクロマトグラフィを導入することにより、S-S 異性体を含む不活性な tPA との分離に成功し、高純度の活性型 tPA を得ることが出来た。市販の tPA 製剤は CHO 細胞で生産されているが、付加される糖鎖の不均一性の問題がある。本研究で確立した手法では糖鎖が付加されず、この様な問題は起こらない。加えて、X 線結晶構造解析の試料としても適しているので、蛋白質の立体構造に基づく薬物デザインへの発展も期待できる。

tPA, amyloid, plasmin

講演番号：3A24a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A24 会場

亜鉛要求性エクト型酵素 ALP の局在の違いに着目した活性化機構の解析

Is the activation mechanism of zinc-requiring ectoenzyme, ALP, affected by the differences in the subcellular localization?

○松永 麻佑、神戸 大朋（京都大生命）
○Mayu MATSUNAGA, Taiho KAMBE (Kyoto Univ.)

【目的】 亜鉛は生体内で必須の微量金属元素であり、その広範な機能故に厳密に制御されることが重要である。その制御の中でも、2 つの亜鉛トランスポーターファミリーZNT 及び ZIP は膜輸送を介して細胞内外の亜鉛濃度を調節しており、特に ZNT5、ZNT6 及び ZNT7 は、ゴルジ体と小胞体で形成される初期分泌経路に局在し機能を果たしている。当研究室では、初期分泌経路に局在する ZNT5、ZNT6 及び ZNT7 と、亜鉛要求性エクト型酵素の一つである Tissue non-specific alkaline phosphatase（TNAP）との解析をすすめ、その活性化機構を明らかにしてきた。さらに、TNAP 以外の様々な亜鉛要求性エクト型酵素の活性化における亜鉛トランスポーター依存性に関して解析をすすめてきた。本研究では、酵素の細胞内局在と活性化機構の関係性に着目し、同一経路で生合成され同じ活性中心を持つが、その活性を果たす局在が異なる膜結合型、及び分泌型の Placental alkaline phosphatase（PLAP）を比較することで、タンパク質の局在の違いがその活性化機構に及ぼす影響について解析を行った。
【実験方法】ニワトリ DT40 細胞の野生株、その *znt5*、*znt6* 及び *znt7* の三重欠損株（以下 TKO 株）、及び TKO 株に ZNT5 及び ZNT6 を再発現させた株に、GPI アンカーを介して細胞膜に結合して膜上で機能する膜結合型 PLAP と、その GPI アンカー欠損型で細胞外に分泌されて機能する分泌型 PLAP を各々過剰発現させた株を樹立した。樹立した細胞における Alkaline phosphatase（ALP）活性と Western Blotting によるタンパク質の挙動をそれぞれ比較した。
【結果及び考察】 ALP 活性においては、膜結合型 PLAP 及び分泌型 PLAP を過剰発現させたどの株においても TNAP と同様の挙動を示したことから、タンパク質の局在の違いはその活性に影響を及ぼさないことが示された。一方、タンパク質の挙動においては、TKO 細胞に膜結合型 PLAP を過剰発現させた株のみ、そのタンパク質を検出することができなかった。そこで、その膜結合型 PLAP 発現 TKO 株をタンパク質分解酵素阻害剤である MG132（プロテアソーム分解阻害剤）及び Bafilomycin A1（リソソーム分解阻害剤）で処理したところ、消失していた膜結合型 PLAP タンパク質の発現は回復した。以上の結果から、ZNT5、ZNT6 及び ZNT7 が欠損すると、GPI アンカーの存在が ALP タンパク質の安定性を低下させ、プロテアソームやリソソームでの分解を促進させていることが明らかとなった。したがって、ALP タンパク質において GPI アンカーの有無を起因とする細胞内の局在の違いは、ZNT5、ZNT6 及び ZNT7 を介した活性化過程に大きな影響を与えないが、ALP タンパク質の安定性を著しく変化させることが明らかとなった。

zinc requiring ectoenzyme, GPI anchor, early secretory pathway

講演番号：3A24a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A24 会場

哺乳類 II 型膜タンパク質の細胞内局在化における膜貫通領域の役割
The role of transmembrane region for subcellular localization of mammalian type II membrane proteins
○亀卦川 樹、越中谷 賢治、向井 有理（明大院・理工・電気）
○Tatsuki KIKEGAWA, Kenji ETCHUYA, Yuri MUKAI (Dept. Electr, Grad. Sch. Sci. & Tech., Meiji Univ.)

タンパク質の細胞内局在化は、タンパク質の正常な機能発現に欠かせない要素である。これまでにオルガネラ移行シグナルの解明や、細胞内局在予測法の開発など、タンパク質の細胞内局在性に関する研究が世界中で行われてきた。しかしながら、それぞれのタンパク質がどのような要因によってどのようなオルガネラを経由し、最終局在位置に局在化するかという点については、その一端しか明らかにされていない。とりわけ膜貫通タンパク質については、細胞内局在化経路とその局在化要因に関する詳細が明らかにされていない。

そこで本研究では、哺乳類の小胞体膜局在・ゴルジ膜局在・細胞膜局在型の II 型膜タンパク質が、細胞内局在化の過程において最終局在位置までに経由するいくつかのオルガネラ間を、どのような要因によって移行するかということを明らかにすることを目的とした。II 型膜タンパク質は、N 末端に小胞体移行シグナルペプチドを持たず、膜貫通領域を 1 つのみ有するシンプルな膜タンパク質であることから、細胞内局在化要因を特定しやすいと考えた。バイオインフォマティクスと細胞分子生物学実験の相補的研究により、膜タンパク質の段階的な細胞内局在化機構の解明を目指している。

バイオインフォマティクス解析：まず、哺乳類の小胞体膜・ゴルジ膜・細胞膜局在 II 型膜タンパク質配列データセットからそれぞれ膜貫通領域周辺のアミノ酸配列を抽出し、位置特異的なアミノ酸出現傾向の解析や細胞内局在性の判別を行った。その結果、II 型膜タンパク質の膜貫通領域周辺配列では、局在化する膜ごとに位置特異的なアミノ酸出現傾向に明確な特徴が見られ、高精度で細胞内局在性を判別することが可能であった。つまり、哺乳類 II 型膜タンパク質では、膜貫通領域周辺の配列が細胞内局在化要因となっている可能性が示された。

細胞分子生物学実験による検証：次に、哺乳類の小胞体膜・ゴルジ膜・細胞膜局在 II 型膜タンパク質から各々のモデルタンパク質を選択し、膜貫通領域周辺を GFP と融合させたタンパク質を HeLa 細胞内でそれぞれ発現させ、細胞内局在性を調査した。その結果、哺乳類 II 型膜タンパク質の小胞体膜とゴルジ膜への局在化には膜貫通領域が本質的であることがわかった。また、細胞膜を最終局在位置とする哺乳類 II 型膜タンパク質については、ゴルジ膜以降の細胞内局在化には膜貫通領域周辺配列以外の要因が必要であることも明らかにした。

type II membrane proteins, subcellular localization, transmembrane region

講演番号：3A24a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A24 会場

アポトーシス促進蛋白質 CDIP1 に対する ALG-2 のカルシウム依存的アダプター機能の解析
Calcium-dependent adaptor function of ALG-2 in the CDIP1-mediated apoptotic pathway

○森 可奈子[1]、犬飼 隆太[2]、高原 照直[2]、柴田 秀樹[2]、牧 正敏[2]([1]名大農・応生科、[2]名大院・生命農)
○Kanako MORI[1], Ryuta INUKAI[2], Terunao TAKAHARA[2], Hideki SHIBATA[2], Masatoshi MAKI[2]
([1]Nagoya Univ. School of Agriculture, [2]Nagoya Univ. Graduate School of Agricultural Sciences)

【背景・目的】ALG-2 (Apoptosis-linked gene 2)は、アポトーシスに必要な因子として発見されたカルシウム結合蛋白質であり、カルシウム結合モチーフである EF-hand を 5 つ連続して持つ。当研究室では、ALG-2 のカルシウム依存的相互作用蛋白質を複数同定してきた。それらのいくつかにおいて、ALG-2 結合領域を決定し、ALG-2 が結合する特異的なモチーフを同定した。CDIP1(Cell death-inducing p53-target protein 1) は、その ALG-2 結合モチーフを有するアポトーシス促進蛋白質であり、昨年、ALG-2 が CDIP1 にカルシウム依存的に結合することを報告した（2017 年度日本農芸化学会大会）。

ALG-2 は 5 番目の EF-hand を介してホモ二量体、あるいは ALG-2 のパラログである peflin とヘテロ二量体を形成する。そして、ALG-2 ホモ二量体が、カルシウム依存的アダプターとして、エンドサイトーシス経路において ALIX と ESCRT-I (endosomal sorting complex required for transport-I) の会合を、また分泌経路において Sec31A とアネキシン A11 の会合を橋渡しすることを明らかにしている。本研究では、ALG-2 を介して CDIP1 に会合する蛋白質を探索し、アポトーシスにおける ALG-2 と CDIP1 の役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】GFP を融合させた CDIP1 (GFP-CDIP1) をヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) に発現させ、抗 GFP 抗体によって免疫沈降した。沈降産物を SDS-PAGE 展開後、既知の ALG-2 相互作用蛋白質の抗体によりウェスタンブロット解析したところ、TSG101 がカルシウム依存的に CDIP1 に結合することが明らかになった。次に、ゲノム編集技術によって作製した ALG-2 をノックアウトした HEK293 細胞を用いて、同様の実験を行った。その結果、GFP-CDIP1 と ALG-2 を共発現させた場合と比較して、GFP-CDIP1 を単独で発現した細胞では、カルシウム存在条件において、GFP-CDIP1 と TSG101 の結合が顕著に減少した。このことから、CDIP1 と TSG101 との結合には ALG-2 がアダプターとして機能していることが示唆された。

TSG101 は ESCRT-I の構成蛋白質であり、VPS28、VPS37、MVB12 とともにヘテロ四量体を形成する。ヒトには、VPS37 は 4 つ (A-D)、MVB12 は 2 つ (A、B) のアイソフォームがある。どの組み合わせの ESCRT-I が CDIP1 に結合しているかを解析した。その結果、VPS37C と MVB12B を含む ESCRT-I が CDIP1 とカルシウム依存的に結合し、一方で、VPS37D と MVB12B を含む ESCRT-I は、カルシウム非依存的に CDIP1 と結合した。よって、CDIP1 と会合する ESCRT-I には特異性があると考えられる。現在、ALG-2 と ESCRT-I が、CDIP1 の局在とアポトーシス誘導活性に与える影響について解析を進めている。

calcium, apoptosis, ESCRT

講演番号：3A24a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A24 会場

ストア作動性 Ca^{2+}流入調節因子 SARAF の翻訳後修飾における ALG-2 の役割
Role of ALG-2 in the post-translational modification of store-operated Ca^{2+} entry modulator SARAF

○村松 彩夏[1]、張 維[2]、寺西 直樹[2]、高原 照直[2]、柴田 秀樹[2]、牧 正敏[2] ([1]名大農・応生科、[2]名大院・生命農)
○Ayaka MURAMATSU[1], Wei ZHANG[2], Naoki TERANISHI[2], Terunao TAKAHARA[2], Hideki SHIBATA[2], Masatoshi MAKI[2] ([1]Nagoya Univ. School of Agriculture, [2]Nagoya Univ. Graduate School of Agricultural Sciences)

【背景・目的】　ストア作動性 Ca^{2+}流入（Store-Operated Calcium Entry, SOCE）は、小胞体（ER）を主とする細胞内カルシウムストアの Ca^{2+}濃度低下が引き金になって、細胞外 Ca^{2+}が流入する仕組みであり、細胞内 Ca^{2+}の恒常性維持に重要な機構である。ER 膜貫通蛋白質である SARAF は SOCE において負の制御因子として働き、過剰な Ca^{2+}流入を抑制する因子として報告されているがその作用機構の詳細は不明である。当研究室では Ca^{2+}センサー蛋白質 ALG-2 の新規相互作用因子探索を行い、ALG-2 が Ca^{2+}依存的に SARAF と相互作用することを明らかにし、さらにその結合部位を同定した（2017 年度日本農芸化学会大会)。ヒト胎児腎細胞（HEK293 細胞）に Strep タグを付加した SARAF を過剰発現させると、Strep-pulldown 産物の SDS-PAGE 後のウェスタンブロット(WB)解析において、しばしば SARAF の主バンドの他に移動度に遅れが生じた複数のマイナーバンドが検出される現象が観察された。本研究は、この新たな泳動遅延バンドの出現が ALG-2 との結合の有無に関係するか否か、そして、この翻訳後修飾が原因と思われる泳動遅延バンドの正体を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】　HEK293 細胞および ALG-2 knockdown HEK293 細胞（ALG-2 KD 細胞）に、StrepHA タグ付加全長 SARAF（StrepHA-SARAF)と、SARAF cytosolic domain （SARAF-CytD）に StrepHA および SGFP2 を融合させた StrepHA-SARAF-CytD-SGFP2 をそれぞれ発現させた。Strep Tactin magnetic beads を用いて細胞破砕液上清の pulldown アッセイを行い、抗 HA 抗体、抗 GFP 抗体および抗 ALG-2 抗体を用いて WB 解析を行ったところ、ALG-2 KD 細胞の方がより明瞭な複数の泳動遅延バンドが検出された。また、HEK293 細胞において、ALG-2 と結合しない SARAF の変異体を発現させた際は、野生型の SARAF を発現させた場合と比較して複数の泳動遅延バンドの出現がより顕著であった。しかし、StrepHA-SARAF-CytD-SGFP2 の各種欠損断片を発現させた実験結果は、泳動遅延バンドの強弱が ALG-2 結合能の有無に必ずしも一致しないことを示唆した。現在、この泳動遅延バンドの抗ユビキチン抗体との反応性、ならびに泳動遅延バンドの出現がユビキチン・プロテアソーム系（UPS）に起因する可能性について各種 UPS 阻害剤を用いて解析中であり、さらに野生型ならびに変異体 ALG-2 の過剰発現効果についても検討中である。

calcium, ubiquitin, post-translational modification

講演番号：3A24a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A24 会場

翻訳後修飾による紫外線損傷 DNA 認識タンパク DDB2 の制御
Control of UV-damaged DNA recognition protein DDB2 by post-translational modification
○荒川 和彦、萩原 遥太、小川 大輝、金岡 英徳、西島 謙一、飯島 信司 (名大院・工　生命分子工)
○Kazuhiko Arakawa, Yota Hagihara, Daiki Ogawa, Hidenori Kaneoka, Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima (Dept. Biomol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

【背景】
我々の体は常日頃から太陽光の下に晒されている。太陽光に含まれる紫外線(UV)は DNA にダメージをもたらし、ダメージの蓄積は皮膚ガンやシワ、シミの原因となっている。我々の体内にはこの DNA ダメージを修復する、ヌクレオチド除去修復(NER)機構が備わっている。紫外線による DNA ダメージには、6-4 光産物(6-4PP)とシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)の 2 種類があり、これらのダメージを認識する複合体も XPC 複合体と UV-DDB(UV-Damaged DNA Binding protein)複合体の二つが存在する。6-4PP は歪みが大きく XPC が直接認識できるのに対し、CPD は歪みが小さいため UV-DDB 複合体の DDB2 が先にダメージを認識し、XPC へと受け渡しを行う。DDB2 は損傷部位でユビキチン化されることがわかっており、このユビキチン化が XPC への受け渡しに重要であると考えられている。NER にはユビキチン化のみならず多くの翻訳後修飾が関わっており、これまでに我々は DDB2 が SUMO E3 リガーゼである PIASy に SUMO 化されることを明らかにした。
【目的・結果】
本研究は DDB2 の SUMO 化メカニズム及びその生理的意義の解明を目的としている。PIASy のノックダウン実験においては、CPD の修復効率が落ち、DDB2 のユビキチン化も弱まっていた。この結果から DDB2 の SUMO 化は NER 機構の進行、及び効率的な NER に必要とされるユビキチン化修飾に関与していることが示唆された。また SUMO 化ターゲットである Lys 残基を DDB2 内でグループ分けし、各グループの Lys を Arg に置換したミュータントを用いて実験を行なった。すると N 末端の Lys に複数変異を加えたミュータントで SUMO 化が検出されず、SUMO 化のターゲット領域が N 末端であることが示された。さらに N 末端の Lys に関して様々なミュータントを作成し、SUMO 化部位のマッピングを行ない、DDB2 の詳細な SUMO 化部位を特定した。
このように我々は修復機構の損傷認識における SUMO 化の意義に関する理解を深め、翻訳後修飾間の関係や DDB2 と XPC 間の関係を明らかにすべく研究を行っている。

UV damage, nucleotide excision repair, SUMOylation

講演番号：3A24p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A24 会場

2 種類のマウスほ乳類キチナーゼのキチナーゼ活性比較

Comparison of chitinolytic activity between two kinds of mouse mammalian chitinases

○木村 将大、梅山 隆敏、脇田 悟誌、大川 一明、坂口 政吉、小山 文隆（工学院大先進）
○ Masahiro Kimura, Takatoshi Umeyama, Satoshi Wakita, Kazuaki Okawa, Masayoshi Sakaguchi, Fumitaka Oyama (Kogakuin Univ.)

キチンは *N*-アセチル D-グルコサミン (GlcNAc) が β-1, 4 結合した重合体で，甲殻類や昆虫の外骨格，そして寄生虫のミクロフィラリア鞘や真菌の細胞壁の成分である。キチンはセルロースに次いで自然界に二番目に豊富に存在する多糖である。ほ乳類はキチンを合成しないが，ヒトとマウスは二種類の活性を有するキチナーゼ，キトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase)，を発現している。Chit1 と AMCase は, 糖質加水分解酵素ファミリー 18 に属しており，細菌類キチナーゼと高めの配列相同性を示す。Chit1 は，ゴーシェ病，慢性閉塞性肺疾患，アルツハイマー病，アテローム性動脈硬化症，糖尿病，嚢胞性線維症，喫煙者で発現が上昇する。AMCase は，喘息モデルマウス，抗原誘導性のアレルギー性肺炎症マウスモデルで顕著に上昇する。しかし，これらの疾患や病態における病態生理学的なほ乳類キチナーゼの役割は不明な点が多い。

本研究ではマウス Chit1 と AMCase を同条件で機能を比較することで, ほ乳類キチナーゼの特徴を評価した。大腸菌で発現したタンパク質は Protein A- Chit1-V5-His, Protein A-AMCase -V5-His からなる融合タンパク質である。大腸菌抽出液を Ni セファロース，HiTrap Q HP カラムを使用し，各酵素を精製した。SDS-PAGE 分析の結果，各酵素が単一バンドで検出できた。また，抗 V5 抗体検出の結果からにより, 目的のタンパク質が精製できたと考えた。次に, 各酵素の活性を同条件下で測定した。4-NP-$(GlcNAc)_2$ を基質とした場合，AMCase は強酸性で高い活性を示し，pH 5~6 付近での活性も Chit1 と同程度であった。$(GlcNAc)_4$ を基質とした場合でも，AMCase は強酸性で高い活性を示し，pH 5~6 付近での活性は Chit1 よりも高かった。これらの結果から, ほ乳類キチナーゼの役割は pH の違いによることが示唆された。

Mammalian Chitinase, Chitinolytic activity, Comparative analysis

発表責任者：木村　将大（bd17002@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3A24p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A24 会場

ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの nonsynonymous SNPs による活性の調節

Chitinolytic activity of human acidic mammalian chitinase is controlled by nonsynonymous SNPs

○小山 文隆、大野 美紗、樫村 昭徳、木村 将大、坂口 政吉、菅原 康里、大川 一明（工学院大学先進工学部）
○Fumitaka Oyama, Misa Ohno, Akinori Kashimura, Masahiro Kimura, Masayoshi Sakaguchi, Yasusato Sugahara, Kazuaki Okawa (Kogakuin Univ.)

酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase) は，喘息とアレルギー性炎症，食物消化に関わっている。しかし，AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見は，とても限られていた。本研究で，我々はマウスとヒト AMCase を大腸菌で発現し，その酵素活性を比較した。組換えヒト AMCase のキチナーゼ活性は，マウス酵素の活性に比べ，約 70 倍低下していた。次に，ヒトとマウスで AMCase のキメラタンパク質を作製し，ヒト AMCase のキチナーゼ活性低下の原因がキチナーゼの活性中心を含む N 末領域に存在することを明らかにした。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は，アミノ酸置換を伴う一塩基多型 (nonsynonymous single nucleotide polymorphism, nsSNPs) にコードされたアミノ酸によって変化した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は，マウス AMCase のアミノ酸配列において保存されているアミノ酸へ変換することで著しく上昇させることができた (N45D, D47N, R61M)。他方，マウス AMCase のキチナーゼ活性は M61 から R61 に置換することで顕著に減少させることができた。さらに，進化的解析から，AMCase の M61 は，ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されたものであった。オランウータンの AMCase は I61 であり，これもマウス AMCase に導入した際にキチナーゼ活性を低下させた。これらのことから，M61 は，AMCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示された。以上のことから，ヒト AMCase キチナーゼ活性が nsSNPs によって制御されていることを明らかにした。

Chitinolytic activity, human acidic mammalian chitinase, nonsynonymous SNPs

発表責任者：小山文隆（f-oyama@cc.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3A24p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A24 会場

ニワトリ酸性キチナーゼの消化酵素としての機能解析

Functional analysis of chicken acidic chitiase as a digestive enzyme

○田畑 絵理、樫村 昭徳、脇田 悟誌、大野 美紗、坂口 政吉、菅原 康里、小山 文隆（工学院大先進工）
○Eri TABATA, Akinori KASHIMURA, Satoshi WAKITA, Misa OHNO, Masayoshi SAKAGUCHI, Yasusato SUGAHARA, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ.)

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β-1, 4 結合した直鎖の高分子化合物で，甲殻類，昆虫，線形動物，真菌類を含む広範囲の生物の主要な構成成分として機能している。このため，キチンは地球上で二番目に豊富に存在するバイオマスである。昆虫や真菌類のようなキチン含有生物は，タンパク質，ミネラル分に富むため，新規の動物飼料源として提案されてきた。家畜飼料としてこれらの生物を用いることの欠点は，キチンが，長らく食物繊維として見なされてきたことである。キチナーゼは，キチンの β-1, 4 結合を加水分解する糖質分解酵素であり，キチンを合成しない生物を含む，広範囲の生物種で発現している。その一つに酸性キチナーゼ (Acidic Chitinase, Chia) がある。Chia は，活性型キチナーゼとして，マウスの胃と肺で高いレベルで発現し，喘息，アレルギーに関わることから，食物消化や，キチン含有病原体に対する免疫応答に働くと考えられている。しかし，ほ乳類以外の動物における Chia の発現レベル，機能に関してはあまり明らかになっていない。そこで我々は，ニワトリの消化器系で，キチンが Chia の活性によって，分解し得ることを示す。まず，ニワトリの主要 11 組織における，Chia mRNA レベルを定量 real-time PCR 法によって解析した。ニワトリ Chia mRNA は，腺胃組織で最も高く発現しており，そのレベルはハウスキーピング遺伝子よりも高く，消化酵素ペプシンの前駆体であるペプシノーゲンに匹敵していた。さらに，その翻訳産物であるニワトリ Chia が，pH 2.0 で強いキチナーゼ活性をもち，消化器系条件下で，胃の消化酵素ペプシンと，腸の消化酵素トリプシンとキモトリプシンに優れた耐性をもっていた。さらに，Chia は消化酵素存在下で，高分子キチン基質のみならず，キチン含有生物である，ミールワームの幼虫の殻に含まれるキチン質を分解し，$(GlcNAc)_2$ を生産した。これらの結果により，キチン含有生物が，ニワトリの新規の飼料として利用可能であることが示唆された。

Chitinase, Chitin-containing organism, Chicken

発表責任者：田畑絵理（bm16024@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3A24p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A24 会場

二枚貝稜柱層における結晶欠陥形成因子の比較

Comparison of the formation factors of crystal defects in the prismatic layer of bivalves

○近都 浩之[1]、奥村 大河[2]、根岸 瑠美[3]、永田 宏次[1]、小暮 敏博[2]、作田 庄平[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大院理、[3]東大分生研)
○Hiroyuki KINTSU[1], Taiga OKUMURA[2], Lumi NEGISHI[3], Koji NAGATA[1], Toshihiro KOGURE[2], Shohei SAKUDA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Dept. of Agriculture, Tokyo Univ., [2]Dept. of Science, Tokyo Univ., [3]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo Univ.)

二枚貝の一種であるアコヤガイの貝殻は異なる構造の 2 層から形成されており、外側の層に炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成る稜柱層構造を有している。稜柱層においては、厚い有機基質の枠組みで囲われた個々の柱状結晶は単結晶性のカルサイト結晶で構成されているが、それらカルサイト結晶の内部にはさらに微量の有機物がネットワーク状に局在し、有機物ネットワークに沿って微小な結晶欠陥が見られる。結晶欠陥は結晶が断裂するへき開を防ぐことから、アコヤガイは結晶欠陥を形成させ貝殻の強度を強めていると考えられる。我々は結晶欠陥形成に有機物ネットワークが関与していると考え、これまでの研究で [1]、ネットワークの構成成分として多糖のキチンとそれに結合しているキチン分解酵素を同定した。さらに炭酸カルシウム結晶形成実験から、分解酵素によって分解されキチン繊維が細くなると、結晶成長時にキチンが炭酸カルシウムと相互作用しやすくなり結晶欠陥が大きくなることが判明した。つまり、アコヤガイ稜柱層ではカルサイトの欠陥形成にはキチンの分解が非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

また二枚貝には、稜柱層カルサイトに結晶欠陥を含む種とほぼ含まない種が存在する [2]。カキの稜柱層カルサイトは、長さがアコヤガイと同程度の約 50 μm であり、カルサイト内部に局在化した有機物が見られ、結晶欠陥を持つ。そのためアコヤガイと同様に分解調節されたキチンが欠陥を誘導していると考えられる。一方で、タイラギの稜柱層カルサイトは長さが約 200 μm であり、カルサイト内に一様に点在した有機物が見られ、結晶欠陥を持たない。このような結晶欠陥の有無は、これまでの研究より、カルサイト内の有機物の違い、特にキチンに関連する有機物に起因すると考えられる。本発表では、LC/MS/MS やトランスクリプトームを用いてカキやタイラギの稜柱層カルサイト内の有機物の構成成分を解析し、それぞれの稜柱層カルサイト内有機物成分の違いを比較することで得られた知見を報告する。

(1) Kintsu, H., et al. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 489:89-95
(2) Okumura, T., et al. (2011) *Cryst. Growth Des*.12:224-230

bivalve, chitin, prismatic layer

講演番号：3A24p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A24 会場

アセチル化模倣型変異体を用いた IDH2 の活性調節機構の構造学的解析
Structural analysis of the regulatory mechanism of IDH2 using acetylation mimics

○徐 玉群[1]、宮川 拓也[1]、劉 凌ウェン[1]、中村 顕[1]、染谷 慎一[2]、田之倉 優[1] ([1]東大院・農生科、[2]フロリダ大・医・加齢研究科)
○Yuqun Xu[1], Takuya Miyakawa[1], Lingwen Liu[1], Akira Nakamura[1], Shinichi Someya[2], Masaru Tanokura[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Dept. Aging Geriatr. Res., Univ. Florida)

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2（IDH2）は、ミトコンドリアに局在し、イソクエン酸の脱水素反応と脱炭酸反応を連続的に触媒し、α-ケトグルタル酸（α-KG）を産生する酵素である。IDH2 はイソクエン酸の脱水素反応とともに、補酵素 $NADP^+$を NADPH に変換する。NADPH は、還元型グルタチオンや還元型チオレドキシンの産生を上昇させ、過剰な活性酸素（ROS）の除去に重要な役割を担っていると考えられている。我々は摂取カロリー制限によりマウスの加齢性難聴が抑制される分子機構として、ミトコンドリアの脱アセチル化酵素である SIRT3 が IDH2 のアセチル化リジン残基を脱アセチル化して活性化させ、内耳細胞の ROS レベルを低下させることを報告している。また、IDH2 において複数のアセチル化リジン残基がこれまでに同定されているが、各リジン残基のアセチル化修飾が IDH2 の活性の調節機構についてはまだ十分に理解されていない。

本研究では、アセチル化模倣体である KQ 変異体（Lys 残基を Gln 残基に置換した変異体）を用いて、IDH2 の活性に影響を与えるリジン残基を解析した。15 種類の KQ 変異体の活性を解析したところ、K256Q と K413Q 変異体の活性が野生型 IDH2 と比べて大きく低下したことが示された。また酵素反応の速度論的解析では、K256Q 変異体のイソクエン酸及び $NADP^+$に対する k_{cat} が野生型 IDH2 と比べて 2 倍低下していた。この結果から、Lys256 のアセチル化は反応速度に影響することが示唆された。一方、K413Q 変異体では $NADP^+$に対する K_m が 3 倍上昇したことから、$NADP^+$への親和性の低下が酵素活性を低下させる一因であることが考えられる。次に、K256Q 変異体の X 線結晶構造解析を行い、イソクエン酸及び Mg^{2+}との複合体構造を分解能 2.3 Å で決定した。IDH2 は L ドメインと S ドメインと呼ばれる 2 つのドメインからなり、S ドメインを介して二量体を形成していた。イソクエン酸と Mg^{2+}は 2 つのドメイン間に形成された溝に結合しており、この溝の傍に Lys256（構造上では Gln 残基）が位置していた。野生型 IDH2 の構造と比較したところ、K256Q 変異体では L ドメインが S ドメインに向かって近づいた結果、活性部位の溝が狭まることで産生物が結合部位から解離し難くなる機構が推定された。また、Lys256 は S ドメイン上の残基で、その周囲には L ドメイン上の 4 つの Lys 残基からなる正電荷クラスターが存在していた。K256Q 変異体の構造変化は、Gln 残基への置換により Lys256 残基の正電荷が失われることで、L ドメインの正電荷クラスターとの静電反発が弱められたためと推測される。同様に、Lys256 残基のアセチル化においても、静電ポテンシャルの変化に基づく共通の活性調節機構が考えられる。

acetylation mimics, isocitrate dehydrogenase, X-ray crystallography

講演番号：3A24p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A24 会場

腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の糖鎖認識機能解析
Carbohydrate recognition of RegIV, an antimicrobial lectin secreted from intestinal epithelium
○柳田 智代、磯野 麻依、渡辺 寛人 (明治大農)
○Tomoyo YANAGITA, Mai ISONO, Hirohito WATANABE (Meiji Univ.)

【目的】
腸管の自然免疫においては、腸管上皮から産生・分泌される抗菌因子が重要な役割を果たしている。われわれは腸管上皮細胞より分泌される抗菌性レクチン RegⅣについて解析を行い、これまでに RegⅣがマンナンや LPS に結合すること、RegⅣがグラム陽性菌、グラム陰性菌および真菌に対し幅広い抗菌活性を発揮することなどを明らかにしてきた。一方で、RegⅣ mRNA は腸管内分泌細胞にも発現していることから、内分泌因子としても機能すると推定されるが、その詳細は不明である。
本研究では RegⅣの生理機能の一端を解明することを目的とし、細胞表面に存在する糖鎖に着目してこれらに対する RegⅣの結合能の解析を行った。
【方法および結果】
大腸菌により発現し、精製したヒト組換え RegⅣを用い、Epoxy-activated Sepharose 6B にマンナンをカップリングさせた樹脂への結合能を評価した。その結果、RegⅣは pH 6.0 においてマンナンに結合することが確認された。糖結合性の評価にあたっては、多糖についてはカップリングゲルへの RegⅣの結合性を解析し、単糖・オリゴ糖については RegⅣのマンナンカップリングゲルへの結合を阻害しうるか解析した。
はじめに、細胞表面に多く存在するヘパラン硫酸について検討したところ、ヘパラン硫酸カップリングゲルへの結合が示された。さらにヘパラン硫酸の構成糖である D-グルクロン酸および *N*-アセチル-D-グルコサミンをそれぞれ共存させた場合にもマンナンカップリングゲルへの結合が強く阻害された。これらのことから RegⅣがヘパラン硫酸に結合しうること、D-グルクロン酸および *N*-アセチル-D-グルコサミンをともに認識しうることが示された。
同様に細胞表面に存在する酸性糖鎖について検討したところ、シアリルラクトースへの結合性、およびシアル酸の一種である *N*-アセチルノイラミン酸への結合性が示された。さらに酸性糖鎖のカルボキシ基の重要性を明らかにするため、*N*-アセチルノイラミン酸メチルエステルについて検討したところ、メチルエステル化により RegⅣとの結合性が低下することが明らかとなった。
以上の結果より、内分泌された RegⅣは細胞表面上に存在する幅広い糖鎖に対し結合能を有することが明らかとなった。またシアル酸に結合し、さらにその結合にはカルボキシ基が重要であることが示唆された。

RegIV, carbohydrate recognition, intestinal epithelium

講演番号：3A24p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A24 会場

ビタミン B6 は糖化タンパク質受容体 RAGE に結合する

Vitamin B6 directly binds to the receptor for advanced glycation end-products (RAGE)

○村上 庸人[1]、倉知 遼太郎[1]、三宅 春奈[1]、藤本 汐莉[1]、臼井 照幸[2]、早瀬 文孝[1]、渡辺 寛人[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大)
○Yoto MURAKAMI[1], Ryotaro KURACHI[1], Haruna MIYAKE[1], Shiori FUJIMOTO[1], Teruyuki USUI[2], Fumitaka HAYASE[1], Hirohito WATANABE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【背景】ビタミン B6 は補酵素としてさまざまな代謝・生合成過程に関与するほか、補酵素以外の機能をもつことが報告されている。しかしながら抗炎症など、ビタミン B6 に見出された新たな機能が発揮されるメカニズムに関しては不明の点が多い。一方、われわれは、炎症誘導能を有するメイラード反応後期段階生成物（Advanced glycation end-products; AGEs）の構造－機能相関を解析する過程で、AGEs がその細胞膜受容体（RAGE）のリガンドとして認識されるために必要な構造を特定し、その構造類似性から「ビタミン B6 が RAGE への結合性を有する」との仮説を立てるに至った。本研究ではこの仮説の当否を明らかにすることを目的とし、表面プラズモン共鳴解析を用いた結合解析を行った。

【方法】大腸菌発現系およびグルタチオンセファロース 4B を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、GST と RAGE 細胞外領域との融合タンパク質（GST-sRAGE）を組換えタンパク質として精製した。Biacore システムに基づいた表面プラズモン共鳴解析においては、GST-sRAGE をアミンカップリング法によりセンサーチップに固定化し、positive control の AGEs およびビタミン B6 類と RAGE との直接的相互作用を解析した。

【結果】代表的な AGEs である GLAP および GA-pyridine をセンサーへ添加したところ、濃度依存的にレスポンスが上昇したことから、これら AGEs と RAGE の結合が確認された。ビタミン B6 としてピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミンについてそれぞれ解析したところ、AGEs と同様に RAGE との相互作用が検出され、なかでもピリドキサミンが特に強い親和性を示した。

以上の結果から、ビタミン B6 は炎症誘導に重要な役割をもつ受容体 RAGE に直接結合しうることが示唆された。本研究の成果はビタミン B6 の新たな作用、あるいは新たな作用メカニズムの存在を示唆するものであると考えられる。

Vitamin B6, Receptor for advanced glycation end-products, Advanced glycation end-products

講演番号：3A24p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A24 会場

S-チオール化血清アルブミンによる炎症誘導機構の解明
Inflammatory responses induced by modified serum albumin
○中島 史恵[1]、柴田 貴広[1]、菊地 良介[2]、松下 正[2]、内田 浩二[3] ([1]名大院・生命農、[2]名大院・医、[3]東大院・農学生命)
○Fumie NAKASHIMA[1], Takahiro SHIBATA[1], Ryosuke KIKUCHI[2], Tadashi MATSUSHITA[2], Koji UCHIDA[3] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Med., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】タンパク質の翻訳後修飾はタンパク質の活性、コンホメーション、局在性や安定性だけでなく、他のタンパク質や核酸、脂質、補因子などの生体分子との相互作用を調節し、多彩な生命機能を制御する上で非常に重要な役割を果たしている。しかし、近年になって、タンパク質にリガンド様の活性を付与し、疾病の発症や進展に関わる翻訳後修飾や、生体状態を反映して病態依存的に増加する翻訳後修飾の存在が明らかになってきている。これまでに当研究室において、慢性疾患であるヒトアテローム動脈硬化病巣において血清アルブミン (HSA) の蓄積が起きていること、HSA 画分のマクロファージ細胞への投与によりシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を誘導することが確認されている。さらに、HSA による炎症誘導機構について解析を行った結果、特に酸化型血清アルブミン (oxHSA) が炎症誘導活性を有するとともに、脂質異常症患者血清において oxHSA の割合が増加することを明らかとしてきた。本大会では、oxHSA の機能性について解析した結果を報告する。

【方法・結果】脂質異常症患者血清より単離した oxHSA について翻訳後修飾の解析を行った結果、タンパク質中のシステイン残基と低分子チオール化合物がジスルフィド結合を形成した *S*-チオール化 HSA であることが明らかとなった。そこで、LC-MS/MS を用いて HSA とジスルフィド結合を形成している低分子チオール化合物の網羅的な解析を行った結果、還元型血清アルブミンと比較して、oxHSA ではシステインおよびホモシステインによる修飾が有意に増加していることが明らかとなった。そこで、MALDI-TOF MS を用いて低分子チオール化合物の修飾部位の解析を行った結果、遊離のシステイン残基である Cys34 だけでなく、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基も低分子チオール化合物によって修飾を受けていることが明らかとなった。さらに、*S*-チオール化 HSA の機能性解析を行った結果、*S*-ホモシステイン化修飾によって、タンパク質表面の疎水性領域の増加や低分子化合物との結合能の増加が明らかとなった。また、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA は COX-2 発現誘導活性を有することを明らかにした。以上の結果から、タンパク質分子内に存在するシステイン残基の *S*-ホモシステイン化修飾は、タンパク質の構造および機能性を変化させ、リガンド様活性の付与に関与することが予想された。

serum albumin, inflammation, oxidation

講演番号：3A24p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A24 会場

線虫 *C. elegans* の活性酸素感受性突然変異体の解析
Analysis of the mutant hypersensitive to oxidative stress in *C. elegans*
○高梨 朱央[1]、齋藤 優樹[1]、高氏 裕貴[1,2]、三木 健輔[1,2]、鮎澤 大[1,2]、藤井 道彦[1]（[1]横市大生命ナノシステム、[2]イチバンライフ（株））
○Shuo TAKANASHI[1], Yuki SAITOH[1], Yuki TAKAUJI[1,2], Kensuke MIKI[1,2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ., [2]Ichiban Life Corp.)

老化は加齢とともに生理機能が低下する現象であり、死亡率の上昇とともに様々な老化関連疾患を引き起こす。当研究室では老化のメカニズムを説明する仮説としてフリーラジカル説に着目している。反応性の高いフリーラジカルは生体内でタンパク質、脂質、核酸等様々な生体構成分子を傷つけ細胞の機能低下や酸化的障害の蓄積(酸化ストレス)をもたらす。特にフリーラジカルの中の活性酸素種（ROS）が老化の原因の一つとして注目を集めている。酸素は好気性生物の生存に必須であるが、様々な代謝の過程で ROS を生じる。そのため、生物は ROS に対する防御機構を発達させてきた。抗酸化酵素としてはスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等が有名であるが、それら以外にも多くの遺伝子が ROS の産生や消去に関与していると考えられている。また様々な生物種の長寿命変異体の解析から、長寿命変異体の多くは ROS などの環境ストレスに抵抗性を示すことが知られており、ROS と寿命の間の関連性が示唆されている。

当研究室ではこれまでの研究で、モデル生物線虫 *Caenorhabditis elegans* を用い様々な ROS 高感受性な突然変異体を分離してきた。最近の研究で、ROS に高感受性でかつ短寿命な変異体 *oxy-7* 突然変異体の原因遺伝子の同定にも成功した。本発表では *oxy-7* 遺伝子の同定およびその機能の解析について報告する。

Caenorhabditis elegans, oxidative stress, aging

講演番号：3A24p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A24 会場

出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae を用いた 5-ブロモデオキシウリジン作用機構の解明
Analysis of the mechanism for the action of 5-bromodeoxyuridine in Saccharomyces cerevisiae
○堤 杏子[1]、圓 敦貴[1]、高氏 裕貴[1,2]、三木 健輔[1,2]、鮎澤 大[1,2]、藤井 道彦[1]([1]横浜市立大学、[2]イチバンライフ（株））
○ Anzu TSUTSUMI[1], Atsuki EN[1], Yuuki TAKAUZI[1,2], Kensuke MIKI[1,2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Grad.Sch.of Nanobiosci,Yokohama City Univ., [2]Ichiban Life Corp.)

哺乳類の正常体細胞を生体から取り出して培養すると、一定回数の細胞分裂の後に増殖を停止する。この現象は細胞老化と定義され、細胞の肥大化、扁平化などの形態変化や老化細胞特異的な遺伝子発現の変化が見られる。

我々の研究室では、チミジン類似体である 5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)を哺乳類動物培養細胞に投与すると、速やかに細胞老化を誘導し、クロマチン構造の変化を引き起こすことを見出した。BrdU の作用機構を解明することは、細胞老化のメカニズムの解明に役立つと考えられるが、現在、その詳細な作用機構は明らかにされていない。そこで、遺伝学的解析の容易な出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いて BrdU の作用機構の解明を試みた。

細胞外のチミジン(dThd)はチミジンキナーゼ(TK)によりチミジン一リン酸(dTMP)へ変換され、チミジン三リン酸(dTTP)を経て DNA へ取り込まれる。しかし、出芽酵母は TK 遺伝子を持たないため、dThd や BrdU を DNA へ取り込めない。そこで、本研究では出芽酵母にヘルペスウィルス由来の TK 遺伝子を発現させ外部よりチミジンを取り込めるようにし、更にチミジル酸合成酵素を破壊し、de novo での dTMP の供給を絶つことにより構築したチミジン要求性株を用いた。

作製したチミジン要求性株は BrdU を取り込むと速やかに細胞分裂を停止した。そこで BrdU の細胞増殖抑制機構を調べる目的で、BrdU 投与により変動する遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析した。本発表では、それらの結果について報告する。

Saccharomyces cerevisiae, 5-bromodeoxyuridine(BrdU)

講演番号：3A25a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A25 会場

アミノペプチダーゼ B の基質特異性解析

Substrate specificity analysis of aminopeptidase B

○大西 敦、辻本 雅文（帝京平成大薬）
○Atsushi OHNISHI, Masafumi TSUJIMOTO (Teikyo-Heisei Univ.)

【目的】アミノペプチダーゼ B（APB）は、M1 ファミリーに属し、N 末端が塩基性アミノ酸であるペプチドを特異的に切断するエキソペプチダーゼである。APB はヒトの組織・器官においてはユビキタスに発現していることが分かっており、miniglucagon、CCK8 の例では、ペプチド前駆体から成熟ペプチドへのプロセシングに関与することが報告されている。これらの情報から、ヒト APB は肝細胞でのグリコーゲン分解、脳神経系における神経伝達の調節などに関与していると予想される。しかしながら、生体内において APB の基質となる生理活性ペプチドはほとんど知られておらず、加えて N 末端の塩基性アミノ酸を特異的に切断するその基質認識メカニズムも解明されていない。

M1 ファミリーの一次配列を比較した結果、APB と Leukotriene A4 hydrolase（LTA4H）間では他の M1 ファミリー酵素と比べて GXMEN モチーフ近傍のアミノ酸配列の相同性が非常に高かった。しかしながら、GXMEN モチーフに隣接する N 末端側のアミノ酸が APB では Phe（Phe297）であるのに対して、LTA4H では Tyr であるという違いがみられた。APB、LTA4H の分子モデリングを行った結果、この Phe、Tyr の違いは基質ポケットの空間を変化させ、酵素活性、および基質特異性に影響を与える可能性が示された。そこで APB の Phe297 に注目し、基質特異性に影響を与えるか否か確認した。

【方法】野生型、および 2 種類の APB 変異体（Phe297Tyr, Phe297Ala）の組換えタンパク質を作製し、精製を行った。野生型 APB、APB 変異体の酵素学的性質を確認するため、人工基質（X-MCA）、および生理活性ペプチド[Arg_0]-Met-enkephalin、Kallidin を用いて解析した。

【結果】人工基質（X-MCA）を用いて野生型 APB と APB 変異体の酵素活性、および基質特異性の差違を調べた結果、Phe297 の変異は加水分解活性の顕著な低下を導いた。加えて塩化物イオン（Cl^-）の感受性にも影響を与えることも示された。さらに APB の基質となる生理活性ペプチド、[Arg_0]-Met-enkephalin、Kallidin を用いて調べた結果、Phe297 の変異は人工基質と同様に加水分解活性、および Cl^-感受性の低下を導いた。

以上の結果から、APB の活性中心に局在する Phe297 は、そこに Cl^-を保持するのに十分な空間の形成に関与していることが示唆された。加えてこの Phe297 による基質ポケットの形成は、Cl^-を介した基質の N 末端アミノ酸残基と Gln169 の相互作用を可能にし、生理条件下における APB の酵素活性の発現に関与することも示唆された。また APB の P1 部位の N 末端アミノ酸認識にも Phe297 は必要であり、この残基は S1 部位の形成にも重要である可能性が示された。

aminopeptidase B, substrate specificity, catalytic pocket

講演番号：3A25a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A25 会場

Grimontia hollisae および *Clostridium* 属コラゲナーゼの比較研究：酵素活性への緩衝液と塩の影響と反応機構への洞察

Comparative studies on *Grimontia hollisae* and *Clostridium collagenases*: the effects of buffers and salts on the enzyme activities and insights into the reaction mechanisms

○滝田 禎亮[1]、銭 鈞[1]、耿 紅敏[1]、何 澤剣[1]、根本 翔[1]、森 真璃子[1]、田中 啓友[2]、服部 俊治[2]、兒島 憲二[1]、保川 清[1] ([1]京都大農、[2]株式会社ニッピ)

○Teisuke Takita[1], Jun Qian[1], Hongmin Geng[1], Zejian He[1], Sho Nemoto[1], Mariko Mori[1], Keisuke Tanaka[2], Sunji Hattori[2], Kenji Kojima[1], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nippi Inc.)

【目的】*Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B のコラゲナーゼ（Ghcol）は、高い活性と安定性を有し、細胞分散剤やデュピュイトラン拘縮の治療薬として期待されている [1)]。その反応機構を調べるため、各種基質に対する分解活性への緩衝液、$CaCl_2$、NaCl の影響を調べ、*Clostridium* 属コラゲナーゼ（Chcol）と比較した。活性の pH 依存性から Ghcol と Chcol の活性解離基を推定した。

【方法】Ghcol の成熟型領域を *Brevibacillus* 中で発現させ、硫安分画と陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Chcol は市販品を用いた。合成基質、MOCAcKPLGL(Dpa)AR と FALGPA（下線はアミノ酸残基）を用い、前者の反応は蛍光強度、後者の反応は吸光度を測定した。

【結果】Ghcol と Chcol は、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドを示した。それぞれの分子量は約 6 万と 6.6 万であり、精製過程で部分的に分解したと考えられた。5 mM HEPES（pH 7.0）、25ºC において、Ghcol は、Chcol に比べ、350 倍高い MOCAcKPLGL(Dpa)AR 分解活性を示した。Ghcol の MOCAcKPLGL(Dpa)AR 分解活性は、どの緩衝液でも濃度上昇とともに大きく減少したが、Chcol では変化しなかった。Ghcol の FALGPA 分解活性は、どの緩衝液でも濃度上昇とともに大きく増加し、Chcol でもわずかに増加した。Ghcol の MOCAcKPLGL(Dpa)AR 分解活性は、2 mM $CaCl_2$ あるいは 20 mM NaCl で消失したが、Chcol のそれは残存した。Ghcol の FALGPA 分解活性は、$CaCl_2$ あるいは NaCl 濃度上昇とともにわずかに増加し、Chcol も同様であった。両酵素の FITC 標識コラーゲン分解活性は、0-15 mM $CaCl_2$ で大きな変化はなかった。25−45℃での Ghcol と Chcol の MOCAcKPLGL(Dpa)AR 分解活性（k_{cat}/K_m）の pH 依存性は、中性付近をピークとしたベル型曲線であった。活性解離基の解離定数の温度依存性から、活性解離基のプロトン解離に伴うエンタルピー変化（ΔH^o）は、酸性側と塩基性側が、それぞれ、Ghcol では-31 kJ/mol と 20 kJ/mol、Chcol では-17 kJ/mol と 55 kJ/mol と算出された。

【考察】Ghcol は高いコラーゲン分解活性を有するが、そのペプチド分解活性は緩衝液や塩の影響を受けやすく、その程度は MOCAcKPLGL(Dpa)AR を用いたとき特に顕著である。この結果は、本基質結合部位周辺へのこれら低分子物質の結合を示唆した。Ghcol の酸性側と塩基性側の活性解離基は、それぞれ Glu493 と His578、Chcol では、対応する Glu 残基と Tyr 残基であると推定された [2)]。

【参考文献】

1. N. Teramura et al. *J. Bacteriol.* **193**, 3049-3056 (2011)

2. T. Takita et al. *J. Biochem. in press*

collagenase, *Grimontia hollisae*, *Clostridium*

講演番号：3A25a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A25 会場

植物病原菌エフェクターRipAY の宿主チオレドキシン依存的な活性化機構の解析
The activation mechanism of RipAY, a plant pathogen effector protein, activated by eukaryotic thioredoxins
○藤原 祥子、池尻 篤生、田中 直孝、田淵 光昭 (香川大学)
○Shoko FUJIWARA, Atsuki IKEJIRI, Naotaka TANAKA, Mitsuaki TABUCHI (Kagawa Univ.)

ヒトや植物に感染する病原菌の多くは、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して、宿主細胞内にエフェクターと呼ばれる病原因子を注入することで感染を成立させている。エフェクターの分子機能の解明は、病原菌の感染戦略を理解する上で重要である。ナス科を始めとする農作物に感染し、深刻な被害をもたらす植物病原菌である青枯病菌は、70 種以上のエフェクターを持つことが知られているが、その多くの機能は明らかになっていない。
一部のエフェクターは酵母細胞において発現させると、宿主標的因子の酵母カウンターパートに作用することにより酵母増殖阻害を引き起こすことが知られている。我々は酵母増殖阻害を引き起こす青枯病菌のエフェクターのうち、RipAY/RSp1022 に着目し機能解析を行ってきた。今までの研究で、RipAY が細胞内レドックス恒常性維持に必須の役割を果たすグルタチオン (GSH)を分解するγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)であること、本酵素は青枯病菌細胞内で不活性な状態として合成され、宿主真核生物由来の未同定の活性化因子チオレドキシン (Trx) によって活性化することを明らかにした。RipAY は宿主細胞中で Trx により活性化され、宿主内在性の ChaC タンパク質よりもはるかに高い活性で、宿主細胞内の GSH を枯渇させることで病原性を発現することが考えられた。
RipAY は、GGCT 活性に必須な ChaC ドメイン配列の N 末端と C 末端に、それぞれ 123、103 アミノ酸残基からなる特異的な配列を有している。ChaC ドメインの N 末端または C 末端領域のいずれかを欠損させた RipAY 欠損変異体は、Trx との相互作用を示さず、酵母に対する増殖阻害活性を失うことが明らかになった。以上のことから、RipAY の N、C 末端領域は、RipAY の GGCT 活性化に必須であることが示唆された。
さらに、RipAY の活性化様式を分子構造的に明らかにするため、RipAY の結晶化し、X 線による結晶構造解析を目指している。当研究室では、RipAY のシロイヌナズナの Trx ホモログである *At*Trx-h5 と、His タグを付加した RipAY を、同一プロモーターによって大腸菌内で共発現させ、複合体の状態で大量精製することに成功した。また、この精製タンパク質複合体は GGCT 活性を維持していることを確認した。精製した RipAY-Trxh5 複合体を電気泳動後、蛍光染色によってバンドを検出し、バンドの強度から RipAY 分子あたりの *At*Trx-h5 結合量を定量的に解析したところ、RipAY 単一分子に対して約 2 分子の Trx が結合していることが推定された。

pathogen effector, glutathione, thioredoxin

発表責任者：田淵　光昭（mtabuchi@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A25a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A25 会場

Pseudoxanthomonas mexicana WO24 由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の基質認識機構の解明
Elucidation of substrate recognition mechanism for Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24

○中村 彰宏[1]、本間 宣行[1]、六本木 沙織[2]、鈴木 義之[1]、志田 洋介[1]、阪本 泰光[2]、飯塚 一平[2]、伊中 浩治[3]、田仲 広明[4]、木平 清人[5]、山田 貢[5]、吉崎 泉[5]、合田 浩明[6]、野中 孝昌[2]、田中 信忠[6]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大、[2]岩手医科大、[3]丸和栄養食品、[4]コンフォーカルサイエンス、[5]宇宙航空研究開発機構、[6]昭和大)
○Akihiro NAKAMURA[1], Nobuyuki HONMA[1], Saori ROPPONGI[2], Yoshiyuki SUZUKI[1], Yosuke SHIDA[1], Yasumitsu SAKAMOTO[2], Ippei IIZUKA[2], Kozi INAKA[3], Hiroaki TANAKA[4], Kiyohito KIHIRA[5], Mitsugu TAMADA[5], Izumi YOSHIZAKI[5], Hiroaki GOUDA[6], Takamasa NONAKA[2], Nobutada TANAKA[6], Wataru Ogasawara[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Iwate Med. Univ., [3]Maruwa Foods and Biosci. Inc., [4]Conf. Sci. Inc., [5]JAXA, [6]Showa Univ.)

Dipeptidyl peptidase(DPP)は、ペプチド鎖の N 末端からジペプチドを遊離する活性を持つエンドペプチダーゼの 1 種である。DPPIV は基質 P1 の Pro/Ala に特異性を示すセリンペプチダーゼであり、S2 subsite よりもさらに N 末側に開いた空間的構造(S2-ex)を持つ。DPPIV は多くの生物種でオルソログが報告されており、特にヒト DPP IV(HsDPP IV)は、様々な生体反応に関与し、薬剤標的として阻害剤が開発されるなど、積極的に研究されている。その一方で、真正細菌由来 DPP IV についての知見は少ない。これまでに歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 DPP IV および多剤耐性日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DPP IV が解析されているが、リガンドとの共結晶構造が未取得など、基質認識機構に未解明な部分が多い。これら両菌のような種々の病原性細菌が DPP IV を保持しており、DPP IV が生育に関与する酵素であることが示唆されている。そのため、細菌由来 DPP IV の特異的阻害剤は、新規作用機序を有する抗菌薬になりうる。本研究では細菌特異的薬剤開発を目指し、好気性グラム陰性細菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DPP IV (PmDAP IV)の酵素学的解析を行うとともに、HsDPP4 との基質認識機構の差異を調査した。

PmDAP IV を *E. coli* を用いた異種宿主発現により発現・精製した。精製酵素の Gly-Pro-MCA 基質に対する比活性、K_mおよび k_{cat}は、それぞれ 14.4 U/mg、19.4 μM および 19.2 /s であった。さらに、我々は PmDAP IV の単結晶構造および Lys-Pro、Ile-Pro、非ペプチド系阻害剤との共結晶構造取得に成功した(それぞれ 2.47、1.90、2.33、2.13 Å の分解能)。PmDAP IV と HsDPP IV のアミノ酸の相同性は 24%と低い一方で、触媒残基周辺の構造は極めて類似していた。立体構造から PmDAP IV の Arg106 残基が基質認識に関与している可能性が見出されたため、PmDAP IV R106A および R106K 変異体を構築し、部位特異的変異解析を行った。その結果、両変異体において比活性および k_{cat}が減少した。このことから、Arg106 側鎖の加水分解活性への寄与が示唆された。さらに PmDAP IV と HsDPP4 との基質認識機構の差異を調べるため、既知 HsDPP IV 阻害剤の gliptin 類を用いて阻害試験を実施した。その結果、Class 2 および Class 3 の gliptin 類で PmDAP IV に対する阻害率が著しく低いことが示された(Class 2, S2 から S2’ subsite に結合; Class 3, S2-ex から S1 subsite に結合)。このことは PmDAP IV に特異的な阻害剤開発の可能性を示唆する。そこで、基質収容ポケット周辺の構造を PmDAP IV と HsDPP IV で比較したところ、HsDPP IV に比べ PmDAP IV は S2’ subsite が狭く、S2-ex が広いことを見出した。この結果は、細菌特異的阻害剤の開発において S2-ex を標的にすることが可能であることを示唆している。

Dipeptidyl peptidase, S9 peptidase, Inhibitor

発表責任者：中村彰宏（s131073@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3A25a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A25 会場

部位特異的変異導入解析による Family S46 ペプチダーゼの基質認識残基の同定
Identification of substrate recognition residues in Family S46 peptidase based on site-directed mutagenesis analysis

○本間 宣行[1]、中村 彰宏[1]、六本木 沙織[2]、鈴木 義之[1]、志田 洋介[1]、阪本 泰光[2]、飯塚 一平[2]、伊中 浩治[3]、田仲 広明[4]、木平 清人[5]、山田 貢[5]、吉崎 泉[5]、合田 浩明[6]、野中 孝昌[2]、田中 信忠[6]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大、[2]岩手医科大、[3]丸和栄養食品、[4]コンフォーカルサイエンス、[5]宇宙航空研究開発機構、[6]昭和大)
○Nobuyuki Honma[1], Akihiro Nakamura[1], Saori Roppongi[2], Yoshiyuki Suzuki[1], Yosuke Shida[1], Yasumitsu Sakamoto[2], Ippei Iizuka[2], Koji Inaka[3], Hiroaki Tanaka[4], Kiyohito Kihira[5], Mitsugu Yamada[5], Izumi Yoshizaki[5], Hiroaki Gouda[6], Takamasa Nonaka[2], Nobutada Tanaka[6], Wataru Ogasawara[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Iwate Med. Univ., [3]Maruwa Foods and Biosci. Inc., [4]Confocal Sci. Inc., [5]JAXA, [6]Showa Univ.)

Family S46 ペプチダーゼは、ペプチド鎖のアミノ末端からジペプチドを遊離する Dipeptidyl peptidase(DPP)活性を持つエキソペプチダーゼであり、ペプチダーゼ Clan PA に属する。Clan PA はトリプシン等のエンドペプチダーゼで主に構成されるペプチダーゼ最大の Clan であるが、その中でも Family S46 のペプチダーゼだけが唯一エキソ活性を有している。また、Family S46 ペプチダーゼは、グラム陰性好気性菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 (Dipeptidyl aminopeptidase BII、PmDAP BII)、歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* (PgDPP7 および PgDPP11)や多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (SmDPP7 および SmDPP11)等の糖非発酵性グラム陰性細菌に存在し、ペプチド代謝機構に重要な酵素であると考えられている (Nemoto,Y. *et al.* 2012)。

我々は Family S46 ペプチダーゼの X 線結晶構造解析により、PmDAP BII と PgDPP11 の立体構造を世界に先駆け決定した (Sakamoto *et al.* 2014; Sakamoto *et al.* 2015)。さらに立体構造解析と部位特異的変異導入解析により、PmDAP BII の G675 に相当する残基 (S1-1) が Family S46 ペプチダーゼの基質 P1 部位認識へ関与していることが明らかにした。しかし、PgDPP7 は S1-1 が PmDAP BII の G675 と共通であるが、脂肪族および芳香族側鎖に対する特異性が大きく異なる。そのため、S1-1 以外の基質認識残基の存在が示唆されている。

本研究では、これら特異性の差異の原因を解明すべく、基質 P1 を認識する基質 S1 サブサイトの新規残基 (S1-X) の同定を試みた。そこで PmDAP BII の立体構造解析および情報学的解析を行った結果、S1-X として S679、S682、M693 を推定した。これら推定 S1-X の基質認識への寄与を解析するために、各残基を PgDPP7 型に変異した PmDAPBII 変異体 S679A、S682G、M693T を作成し、酵素学的解析を行った。その結果、S682G において基質 P1 の脂肪族および芳香族側鎖に対する特異性が減少した。この比活性の傾向は PgDPP7 と類似していることから、S682 の基質認識の関与が示唆された。そこで、S682 の Family S46 ペプチダーゼ群における機能を解析するために、この残基を他の S46 ペプチダーゼ群で保存されている残基に変異した PmDAP BII 変異体 S682A、S682K を構築し、酵素学的解析を行った。その結果、これら変異体において S682G 同様、顕著な活性の減少がみられた。これらの結果から PmDAP BII の S682 を基質 P1 を認識する新規残基 S1-2 として同定した。

S46 Peptidase, Site-Directed mutagenesis analysis, Structural analysis

発表責任者：本間　宣行（s141080@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3A25a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A25 会場

Pimelobacter 由来 metzincin メタルプロテアーゼの構造と機能
Some properties of metzincin metalloproteinase from *Pimelobacter* sp. Z-483
○大橋 大志[1]、浴野 圭輔[2]、尾山 廣[1]([1]摂南大理工、[2]崇城大生物生命)
○Taishi OOHASHI[1], Keishuke EKINO[2], Hiroshi OYAMA[1] ([1]Setunan Univ., [2]Sojo Univ.)

【目的】*Pimelobacter* sp. Z-483 株が菌体外に分泌するアルカリプロテアーゼ(Z-483-P)は、分子量が 23kDa、最適反応条件を pH9.0、50℃にもち、1.10-Phenanthroline や $HgCl_2$ で酵素活性が阻害され、EDTA や phosphoramidon に阻害されないユニークな性質を有する。本研究では、Z-483-P の触媒機構の解析を目的に、プレプロ配列を含む Z-483-P 遺伝子から推定したアミノ酸配列を基に触媒残基と所属ファミリーの推定を行うと共に、Z-483-P 遺伝子の大腸菌での発現を試みた。
【方法】Z-483-P 遺伝子の発現は、*Escherichia coli* KRX 株と pET25b ベクターを用いた。組換え大腸菌は LB 培地で培養し、ラムノースと IPTG により Z-483-P 遺伝子の発現を誘導した。菌体破砕上清と残渣をサンプルに、抗 His-tag 抗体によるウエスタンブロッティングで Z-483-P 遺伝子の発現を確認した。酵素の精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーや Ni 担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを組合せて行った。酵素活性は、サンプルを 1.10-Phenanthroline で処理後、カゼインフォーリン法またはカゼインプレート上のハローの大きさから算出した。
【結果・考察】Z-483-P の推定アミノ酸配列には、HEXXHXXGXXH モチーフと Met-turn(SIMHY モチーフ)が保存されており、metzincin スーパーファミリーに属することが推察された。このファミリーに属する細菌由来の酵素、serralysin や myroilysin との一次構造上の相同性は低く、システインスイッチ活性化メカニズムに関与する残基も保存されておらず、これらとは異なるタイプであると考えられた。次に、大腸菌のペリプラズム移行シグナル(*pelB* 配列：22 残基)の下流にプレプロ前駆体及び成熟酵素領域の遺伝子をそれぞれ連結し、*E. coli* KRX 株を形質転換した。Abs_{600} が 0.7 のときに 25℃、3 時間、0.1%ラムノース(終濃度)で発現を誘導したところ、いずれも大部分が封入体となり、酵素活性を示さなかった。そこで、SignalP4.1 でシグナルペプチドと予測された N 末端から 29 残基を欠損させた変異体(Δ29)を作製し、同様に発現させたところ、菌体破砕上清画分に可溶型酵素(約 23kDa)として存在した。Δ29 は、シグナルペプチドペプチダーゼの切断配列の後にベクター由来の 10 残基が付加されたため、プロペプチドの N 末端領域が野生型とは異なるが、大腸菌内で成熟型酵素へとプロセシングされ酵素活性が発現された。Z-483-P は比較的広い基質特異性を有しており、大腸菌内で正常にプロ前駆体として folding された後、自己触媒的に成熟体にプロセシングされたものと推察した。現在、組換え酵素を精製し、酵素化学的な諸性質を検討しており、HEXXHXXGXXH モチーフの部位特異的改変体の解析で触媒残基を同定する予定である。

metzincin, signal peptide, processing

講演番号：3A25a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A25 会場

Pseudomonas nitroreducens 由来 γ－グルタミルトランスペプチダーゼの反応特性に関わるアミノ酸残基の機能解析

Function analysis of amino acid residues responsible for catalytic properties of gamma-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*

○若山 守[1]、佐野 千晴[1]、日幸 隆雄[2]、伊藤 貴文[2]、林 順司[1] ([1]立命館大学、[2]福井県立大学)
○ Mamoru Wakayama[1], Chiharu Sano[1], Takao Hibi[2], Takafumi Ito[2], Junji Hayashi[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Fukui Prefectural Univ.)

「緒言」γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は，γ－グルタミル化合物の転移反応と加水分解反応を触媒する酵素である。本研究では，テアニンの合成に優れ、既報の GGT と異なる特性を示す *Pseudomonas nitroreducens* 由来の GGT（PnGGT）に着目した。結晶構造解析の結果、W385、F417、W525 が PnGGT の反応特性に関わると推定されたことから，これらの変異酵素を作製した。その結果，これらのアミノ酸残基はいずれも反応特性の決定に大きく関与している可能性が示唆された。

今回は、そのうち W525 に着目して，この位置のアミノ酸残基の機能について検討した。

「方法と結果」W525 を各種アミノ酸に置換した変異酵素(W525F, W525V, W525A, W525G, W525S, W525D, W525K)を作製し，DEAE-cellufine ならびに Butyl-FF カラムクロマトグラフィーにより均一に精製した。これらの変異酵素と野生型酵素の酵素化学的諸性質を調べた。W525F を除いて，他のすべての変異酵素では，γ-Glu*p*NA に対する加水分解活性が大幅に低下する一方，ヒドロキシルアミンに対する転移活性の顕著な上昇が見られた。L-Gln を基質とした加水分解反応においても，W525F では野生型酵素に比べ 10%程度の減少に止まったが，他の変異酵素では 10%未満にまで大きく減少していた。

PnGGT は L-Gln と D-Gln の両方を良いドナー基質とするが，野生型酵素では D-Gln に対する加水分解活性が若干高い。しかし、今回作製したいずれの変異酵素においても，L-Gln に対する活性が上昇していた。以上の結果から，W525 に位置するアミノ酸残基は、特に、ドナー基質の基質認識に影響を与えるとともに，γ-グルタミル化合物の加水/転移の反応性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

gamma-glutamyltranspeptidase, *Pseudomonas nitroreducens*, mutant enzyme

発表責任者：若山　守（wakayama@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3A25a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A25 会場

Pseudomonas nitroreducens 由来 γ－グルタミルトランスペプチダーゼ反応特性の構造生物学的解析
Structural characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from Pseudomonas nitroreducens
○日ビ 隆雄[1]、若山 守[2]、佐野 千晴[2]、伊藤 貴文[1]、林 順司[2] ([1]福井県大生資、[2]立命大理工)
○Takao HIBI[1], Mamoru Wakayama[2], Chiharu Sano[2], Takafumi Itoh[1], Jyunji Hayashi[2] ([1]Fukui Prefectural Univ., [2]RItsumeikan Univ.)

[目的]
Ps. nitroreducens 由来γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(PnGGT)は、これまで報告されてきた他の GGT と異なり、茶葉風味の基となる食品添加物テアニンの合成に有用な性質を有する。本酵素の加水分解活性を抑制し、グルタミル基転移活性を高めるため、結晶構造に基づいて活性中心アミノ酸残基への変異導入を行った結果、Trp525 の芳香族側鎖が PnGGT の反応特性に影響する、すなわち、γ−GlupNA に対する加水分解活性を大幅に低下させる一方、ヒドロキシルアミンに対する転移活性を顕著に上昇させた。
PnGGT のアミノ基転移活性および加水分解活性発現の分子機構を明らかにするため、本研究では、グルタミル基供与体基質のミミックとして、特異的かつ不可逆的に結合する阻害剤 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)、グルタミル基受容体基質としてグリシンの両リガンドを結合させた複合体について X 線結晶構造解析を行なった。さらに、Trp525 に対する部位特異的変異導入と酵素反応の関わりを明らかにするため、W525D 変異体酵素の結晶構造についても解析した。

[方法・結果] PnGGT-DON 複合体結晶および PnGGT-DON-Gly 複合体結晶について X 線回折強度測定を行った。前者は、PF-AR ビームライン NE3A で測定し、空間群 $P2_1$ の本結晶について到達分解能 1.60Å で、回折強度データを収集した。一方、SPring-8 ビームライン BL26B1 で測定し、空間群 $P1$ の本結晶について到達分解能 1.60Å で回折強度データを収集した。いずれも、野生型リガンドフリー酵素を初期モデルとして分子置換法により位相決定を行ない、各複合体構造モデルを得た。
PnGGT-DON 複合体活性中心において、阻害剤 DON は、ジアゾメタンが脱離し活性中心の Thr364 側鎖とエステル結合しており、このエステル結合内のカルボニル炭素に 1 分子の水が水素結合していた。活性中心を覆う芳香族アミノ酸残基のうち Trp385 側鎖の電子密度はほとんど認められず、Tyr170 も一部が欠損しており、アミノ基供与体基質を受け入れやすくしていると考えられた。
PnGGT-DON 複合体にグリシンを結合させた PnGGT-DON-Gly 複合体結晶ではアミノ基受容体基質結合部位が初めて明らかとなった。Asp368 がグリシンのカルボキシル基の結合に関与しているが、それ以外に特異的な水素結合や塩結合を形成する残基はなく、壁を形成する Phe417、Trp385、Trp525 との疎水相互作用が基質認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。
さらに、W525D 変異体酵素の結晶構造を到達分解能 1.75Å で決定した。得られた立体構造に基づいて、Trp525 への変異導入による反応特異性の変化の詳細について報告する。

gamma-glutamyltranspeptidase, X-ray crystallography, enzyme mutant

発表責任者：日ビ隆雄（hibi@fpu.ac.jp）

講演番号：3A25a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A25 会場

新規単量体型 L-スレオニン脱水素酵素の発見と生成物脱離機構の解明
Discovery of novel monomeric L-threonine dehydrogenase and elucidation of product release mechanism

○本山 智晴[1]、中野 祥吾[1,4]、山本 雄大[3]、常盤 広明[3]、浅野 泰久[2,4]、伊藤 創平[1,4]（[1]静岡県大・薬食・食栄、[2]富山県大・工・生工研セ、[3]立教大・理、[4]JST, ERATO）
○Tomoharu MOTOYAMA[1], Shogo NAKANO[1,4], Yuta YAMAMOTO[3], Hiroaki TOKIWA[3], Yasuhisa ASANO[2,4], Sohei ITO[1,4] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Rikkyo Univ., [4]JST, ERATO)

【目的】 短鎖型 L-スレオニン脱水素酵素（TDH）は L-スレオニン（L-Thr）に対して高い特異性を示し、血中アミノ酸濃度の定量による健康診断などに応用が期待できる（1、2）。また、*Trypanosoma brucei* の脂質合成やマウスの ES 細胞の成長に TDH が関与するとされているが、報告は極めて少ない。昨年の農芸化学会年会において、INTMSAlign（3）によるインシリコスクリーニングにより選抜した 87 個の TDH 候補配列と人工設計 TDH について報告した（4）。本発表では、選抜した TDH 候補配列のうち、既存の TDH と比べて 46%と最も配列相同性の低い TDH（mtTDH）について、機能解析、高分解能 X 線結晶構造、量子化学計算および変異体の解析による反応機構の解明を目指した。
【方法】 まず、20 種類のアミノ酸と NAD^+を基質に用い、mtTDH の酵素特性を調べた。L-Thr については、熱安定性の測定、アレニウスプロットによる活性化エネルギーの算出を行った。また、NAD^+、NAD^+と各基質との共結晶を作成、X 線結晶構造解析により構造を取得、得られた構造を用いフラグメント分子軌道（FMO）法によってフラグメント間相互作用エネルギー（IFIE）の算出、mtTDH の変異体（S74A、S111A、Y136F、T177A、D179A、及び D179N）の生化学的解析を組み合わせ、生成物の脱離機構の解明を行った。
【結果・考察】 取得した 87 の TDH 候補配列のうち、最も新規性の高い mtTDH であっても L-Thr に対して高い特異性をもっていたため、TDH はある程度生物に普遍的に存在しており、またより産業利用に向いた TDH が自然界に存在している事が示唆された。mtTDH の結晶構造解析の結果、反応産物である 2-amino-3-ketobutyrate（AKB）との共結晶を含む計 4 状態で立体構造の決定に成功した（分解能 1.25 - 1.9 Å）。構造比較により、6 残基と水 2 分子が AKB 周辺に存在していることが明らかとなった。これら残基と水分子との相互作用を IFIEs により評価したところ、D179 は AKB に対して反発的な相互作用をしており、D179 が反応終了を確認するセンサーとして働いている事が示唆された。さらに、変異体の生化学的解析を行った結果、D179 が生成物の脱離機構に重要であることが明らかとなった。本発表では、高分解能構造、FMO 解析、変異体の生化学的解析を組み合わせることによって解明した TDH の生成物の脱離機構について報告する（5）。

（1）特願 2016-234857（2）S. Nakano *et al*., *J. Biol. Chem*., 2014, **289**, 10445-10454
（3）S. Nakano *et al*., *Sci. rep*., 2015, **5**, 8193（4）日本農芸化学会 2016 年度大会 3J34p05
（5）T. Motoyama *et al*., *Biochemistry*, 2017, **56**, 5758-5770

L-threonine dehydrogenase, *in silico* screening, reaction mechanism

発表責任者：本山智晴（s17212@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A25a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A25 会場

祖先型設計法を用いた L-アルギニン酸化酵素の基質特異性の改変と熱安定化

Modification of substrate specificity and thermalstabilization in L-arginine oxidase by ancestral sequence reconstruction

○丹羽 正純[1]、中野 祥吾[1,3]、浅野 泰久[2,3]、伊藤 創平[1,3]（[1]静岡県大・食栄、[2]富山県大・工・生工研セ、[3]JST. ERATO）
○Masazumi NIWA[1], Shogo NAKANO[1,3], Yasuhisa ASANO[2,3], Sohei ITO[1,3] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Toyama Pref Univ., [3]JST. ERATO)

【目的】
酵素の産業利用において、基質特異性の改変は重要な課題であり、これを達成するためのいくつかのアプローチがある。祖先型設計法は、酵素の分子進化に着目したアプローチであり、基質特異性の高い現代の specific な酵素は基質特異性が広い promiscuous な祖先の酵素から進化してきたと考えられているため、基質特異性の改変や熱安定化が期待できる手法である。そこで本研究では、祖先型設計法を最近取得した L-アルギニン酸化酵素（AROD, EC 1.4.3.25）(1) に適用することで基質特異性の改変を試みた。

【方法】
INTMSAlign（2）を用いた解析により発見した *Oceanobacter kriegii* 由来の AROD (*Ok*AROD) のアミノ酸一次配列を鋳型として *in silico* 解析を行い、約 400 個の AROD 候補配列から 10 配列まで絞り込みをした。これらの配列について MAFFT による配列アライメントを行った後、MEGA を用いて最尤法により系統樹を作製し、祖先型の AROD (*Anc*AROD) の全配列を設計した。系統樹上の節ごとに設計された *Anc*AROD のうち、10 配列の共通祖先型（*Anc*AROD_N0）、最も現代に近い型（*Anc*AROD_N2）及び、その中間に位置する型（*Anc*AROD_N1）の計 3 つの *Anc*AROD の設計を行った。これらの配列には *Ok*AROD と比べ、約 150～200 点の変異があった。これらの発現、精製を行った後、各種酵素化学的な機能解析を行った。

【結果・考察】
設計した 3 つの *Anc*AROD において、いずれも可溶性画分に得ることができた。耐熱性について解析を行ったところ、*Ok*AROD と比べて、*Anc*AROD_N0 は約 20℃、*Anc*AROD_N1 は約 10℃、*Anc*AROD_N2 は約 5℃熱安定性が上昇した。祖先型の酵素は高い耐熱性を有することが報告されている（3）。以上の結果から人工設計した *Anc*AROD は正確に祖先をたどれていることが示唆される。加えて基質特異性に関して、*Anc*AROD_N0 において *Ok*AROD では見られなかった L-His や L-Phe、L-Leu への活性を確認した。本発表では、*Anc*AROD_N0、 N1 、N2 の設計方法、機能解析の詳細について報告する。

[参考文献] （1）D. Matsui *et al., Enzym microb Technol.*, **82** (2016) 151-152（2）S. Nakano *et al., Sci. rep.*, **5**, 8193 (2015),（3）S. Akanuma *et al., PNAS.*, **110(27),** 11067–11072 (2013)

L-arginine oxidase, ancestral sequence reconstruction, modification of substrate specificity

発表責任者：伊藤創平（itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A25a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A25 会場

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼにおける H216 の役割

Role of H216 of D-Threonine aldolase of a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○菅野 裕司[1]、平戸 祐喜[2]、後藤 勝[3]、小池 美弥[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大、[3]東邦理)
○YUJI KANNO[1], YUKI HIRATO[2], MASARU GOTO[3], MIYA KOIKE[1], MINORU TANIGAWA[1], KATSUSHI NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon junior college, [3]Toho Univ.)

【目的】

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は, Volvox 目に属する単細胞生物であり, 全ゲノム配列が解明されている基礎的な生物学的プロセスのモデル生物である. われわれは, *C. reinhardtii* が D-スレオニン耐性を有することと D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) 活性を示すことを見出した. また, DTA をコードする遺伝子の大腸菌へのクローニング, *C. reinhardtii* 中の DTA タンパク質(CrDTA)の検出, CrDTA の結晶構造解析を行った.

本報告では, 基質の結合様式を明らかにすることを目的として, 酵素-基質複合体の結晶構造を解析するとともに, 活性中心に存在するアミノ酸残基の変異体を作製して精製を行い, その役割を明らかにする.

【方法および結果】

DTA の構造情報より活性中心に存在し, 触媒残基であると考えられる 216 番目の His のコドンを Ala のコドンに変異させたプラスミドを作製し, 大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) に導入した. 得られた形質転換体の無細胞抽出液より H216A を, 硫酸アンモニウム分画および DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーによって精製した. 500 µL の酵素反応溶液 (100 mM HEPES buffer, pH 8.1, 5 mM D-スレオニン, 50 µM PLP, 100 µM $MnCl_2$, 200 µM NADH, 13.3 U Alcohol dehydrogenase, 10 µL サンプル) を 50℃で 3 分間インキュベートし, 340 nm における吸光度を経時的に測定し, その傾きより DTA 活性を算出した.

変異体 H216A の活性を算出したところ, wild-type の約 10%の活性を示した. この結果より, His216 が触媒残基であることが強く示唆された.

酵素-基質複合体の結晶構造を解析するために, DTA に基質類縁体を加え結晶化を検討した. 沈殿剤に, ポリエチレングリコール, イソプロパノール, 酒石酸ジアンモニウムを用い, 基質類縁体として DL-2, 3-ジアミノプロピオン酸, *O*-ホスホ-DL-スレオニン, 3-ヒドロキシ-3-フェニルプロピオン酸を用いて, ハンギングドロップ法によって結晶化を試みた. 現在, 得られた結晶の解析を進めている.

D-amino acid, enzyme

講演番号：3A25a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A25 会場

植物疫病菌由来 NAD(P)+依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能・構造解析
Structure and functional analysis of NAD(P)+-dependent L-threonine dehydrogenase from *Phytophthora infestans*
○米田 一成[1]、櫻庭 春彦[2]、荒木 朋洋[1]、大島 敏久[3]([1]東海大・農・バイオ、[2]香川大・農・応用生物科学、[3]大阪工大・工・生命)
○ Kazunari YONEDA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Tomohiro ARAKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3] ([1]Tokai Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

【目的】
NAD(P)+依存性 L−スレオニン脱水素酵素(ThrDH, EC: 1.1.1.103)は NAD(P)+を補酵素として L−スレオニンから L−2−アミノ−3−オキソ酪酸への脱水素反応を触媒する酵素である。既知の ThrDH は中鎖型の亜鉛含有アルコール脱水素酵素ファミリー（MDR ファミリー）に属し、これまでに常温菌や真核生物由来の酵素で機能解析が、超好熱菌由来の酵素では立体構造解析が行われている。一方、南極から単離された低温菌 *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 及び、好熱性アーキアである *Thermoplasma volcanium* 由来の ThrDH は、既知の ThrDH と 1 次構造上非常に低い相同性しか持たないだけでなく、既知の本酵素の活性発現に必須とされる亜鉛結合モチーフもなく、代わりに短鎖型脱水素酵素ファミリー（SDR ファミリー）に属す UDP-galactose 4-epimerase に特有のモチーフを有する特異な 1 次構造有する酵素であることを既に報告している[1-3]。本研究ではこの特異な 1 次構造を有する ThrDH のホモログ遺伝子を植物疫病菌より見出しており、新規なタイプの ThrDH を特異的に阻害する新しい農薬開発の基礎を築くことを目的としている。
【方法・結果】
植物疫病菌である *Phytophthora infestans* のゲノム情報から ThrDH ホモログ遺伝子(PITG_05140)を同定し、遺伝子合成後、pET32a（チオレドキシン融合酵素）ベクターにライゲーションを行った。その後、大腸菌 BL21codon plus (DE3)RIPL を用い IPTG による遺伝子発現を行った。遺伝子発現産物は Talon コバルトアフィニティーカラムで精製を行い、NAD(P)+依存性 ThrDH 活性を有す事を明らかにした。しかし、N 末端に融合しているチオレドキシンタグの活性への影響やタグ切断後の ThrDH の回収効率の悪さから、再度タグを持たない ThrDH のクローニングを行ったところ、pET22b ベクターを使用することで酵素を大量に調製できる事を明らかにした。さらに Red-sepharose で酵素の精製を行った後、PEG600 を沈殿剤として使用することで ThrDH の結晶化に成功した。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行ったところ、2.3 Å のデータを取得することができたため、*T. volcanium* 由来 ThrDH の構造をサーチモデルとして分子置換を行い、位相決定およびモデル構築を行った。今後、本酵素の詳細な酵素化学的性質の決定、および立体構造の精密化を行う予定である。これらの情報は今後、*P. infestans* 由来 ThrDH の酵素阻害剤を設計をする上で重要な情報となりうる。

1) Yoneda K, Sakuraba H, Muraoka I, Oikawa T, Ohshima T. *FEBS J.* 277: 5124-5132, 2010.
2) **米田一成** *ビタミン* 86: 74-83, 2012.
3) Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. *J. Biol. Chem.* 287: 12966-12974, 2012.

L-threonine dehydrogenase, NAD(P)+, *Phytophthora infestans*

講演番号：3A25a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A25 会場

高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した新規 L-アルギニンオキシダーゼの構造解析と新たな基質特異性改変酵素について

Structural analysis of L-arginine oxidase made from L-glutamate oxidase and reserch of new L-amino acid oxidase

○松尾 慎作[1]、北川 征樹[2]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]阪大院・理、[3](株)エンザイム・センサ)
○Shinsaku MATSUO[1], Masaki KIAGAWA[2], Katumi IMADA[2], Hitoshi KUSAKABE[3], Michiko NEMOTO[1], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Okayama Univ, [2]Osaka Univ, [3]Enzyme Sensor Co. Ltd)

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は，L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である．LGOX の基質特異性は極めて厳格であり，バイオセンサーに活用されている．我々は, LGOX の 305 番目のアルギニン残基 (R305)が LGOX の基質認識に最も重要であることを明らかにし，R305 への部位特異的変異導入により，L-His，L-Arg，L-Tyr などに高い活性を示す基質特異性改変酵素の作製に成功している [1)]．今回， R305E 変異 LGOX を作製したところ，R305D 変異 LGOX よりも L-Arg に対して高い活性を示した．そこで R305E 変異 LGOX の性質検討と X 線結晶構造解析を行った. ここでは, 生化学的解析と構造情報に基づいて, LGOX と基質特異性改変 LGOX の基質認識機構を考察する．【方法】変異酵素は，LGOX 発現用ベクターpGOx_mal1 を有する *E. coli* JM109 を用いて発現させ，精製した．酵素活性は，反応生成物である α-ケト酸の定量または過酸化水素の定量を行い測定した．結晶化は 8.7 mg/ml の精製酵素を用いて蒸気拡散法で行い，X 線回折強度データは Spring-8 BL41XU で収集した．【結果】R305E 変異 LGOX は L-Arg に対して厳格な基質特異性を示した．L-Arg に対する *K*m は 0.46 mM であり，触媒効率 k_{cat}/K_m は以前に作製された L-アルギニンオキシダーゼ（R305D 変異 LGOX）の約 2 倍であった. X 線結晶構造解析により R305E 変異 LGOX と基質複合体の構造をそれぞれ 2.65Å，2.7Å 分解能で決定した．結晶構造から，LGOX では R305 と相互作用して基質結合部位に面していなかった D433 と E617 が，305 位の Glu への変異により基質結合部位表面に露出し，基質 L-Arg の側鎖グアニジノ基が E305 以外に D433 と E617 と相互作用することが明らかになった．そこで D433 と E617 へ変異を導入したところ，活性は極端に低下し，両残基が基質認識に重要性であると確認できた。また，この過程で作成した E617K 変異 LGOX は, 主として L-Tyr にオキシダーゼ活性を示すという興味深い結果が得られた．今回の酵素・基質複合体の X 線結晶構造解析と部位特異的変異導入解析から，変異の導入により LGOX の側鎖認識ポケットの構造を様々に変えられることがわかり，LGOX をベースとした更なる基質特異性改変酵素の作製が可能であることが示された．

1) Utsumi, T., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **417**, 951-955 (2012)

L-glutamate oxidase, biosensor, substrate specificity

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3A25a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A25 会場

好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株の D-アミノ酸オキシダーゼの酵素学的諸特性解析
Characterization of D-amino acid oxidase of the thermophilic fungus *Rasamsonia enersonii* strain YA

○七五三掛 湧也、高橋 祥司、阿部 勝正、解良 芳夫（長岡技科大・生物）
○Yuya SHIMEKAKE, Shouji TAKAHASHI, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景】 D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) は，中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD 酵素である．これまでに，DAO は細菌からヒトに至る多様な生物種に見いだされている．DAO はセファロスポリン C の抗生物質原料である 7-アミノセファロスポラン酸への変換や，D-アミノ酸の検出・定量に有用なだけではなく，精神疾患の診断・予防・治療といった応用的利用も期待されている．したがって，高安定性・高活性・広基質特異性を有する DAO が強く求められている．当研究室では，好熱性細菌から高熱安定性 DAO を見いだすことに成功したが，真菌 DAO と比較し，その基質特異性は狭く，触媒活性も低かった．一般的に，真菌 DAO は高活性かつ広基質特異性であることから，未だ報告されていない好熱性真菌 DAO は高い安定性を有しかつ高活性・広基質特異性を有する可能性が高いと考えた．これまでに，当研究室では D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株を堆肥試料から単離し，YA 株の DAO ホモログ (ReDAO) 遺伝子を単離している．そこで今回は，ReDAO 遺伝子の大腸菌における発現および発現産物の酵素学的諸特性を解析したので報告する．

【方法・結果】 ReDAO 遺伝子を pET-15b ベクターに導入し，*E. coli* BL21 (DE3) pLysS において His タグ融合タンパク質として発現させ，発現産物を金属アフィニティークロマトグラフィーにより単一に精製した．各温度と各 pH における ReDAO の活性を測定したところ，ReDAO の至適温度と pH はそれぞれ 55°C と 8.0 であることがわかった．ReDAO を各温度で 1 時間保温した後の残存活性を測定したところ，T_{50} 値（活性の半分が失活する温度）は 60°C であり，工業的に有用な酵母 *Trigonopsis variabilis* DAO（TvDAO）や酵母 *Rhodotorula gracilis* DAO (RgDAO)の T_{50} 値よりも高かった．各 20 mM D-アミノ酸に対する活性を測定したところ，ReDAO は基質特異性の広い RgDAO よりも多様な D-アミノ酸に対して高い活性を示した．興味深いことに，D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質である D-Glu に対しても高い活性を示した．さらに，TvDAO と RgDAO を除く既知の DAO がほとんど活性を示さないセファロスポリン C に対しても，ReDAO は高い活性を示した．ReDAO の活性は，DAO 競合阻害剤である 50 mM 安息香酸とクロトン酸でそれぞれ約 10%と 20%阻害された．また，DDO 阻害剤である D-リンゴ酸でも約 20%阻害された．現在，反応速度論解析，四次構造解析などの他の酵素学的諸特性を解析している．

D-amino acid oxidase, Thermophilic fungi, *Rasamsonia emersonii*

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3A25a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A25 会場

Thermus thermophilus の有する新規セリン生合成酵素の同定と性状解析
Identification and characterization of a novel serine biosynthetic enzyme from *Thermus thermophilus*

○千葉 洋子[1]、島村 繁[1]、吉田 彩子[2]、西山 真[2]、高井 研[1] ([1]海洋研究開発機構、[2]東大生工セ)
○Yoko CHIBA[1], Shigeru SHIMAMURA[1], Ayako YOSHIDA[2], Makoto NISHIYAMA[2], Ken TAKAI[1] ([1]JAMSTEC, [2]Univ. Tokyo)

【背景・目的】

生物の多くは、解糖系の中間産物である 3-phosphoglycerate から 3 ステップの酵素反応を経てセリンを生合成する。これまでに著者らは、3 ステップ目を触媒する酵素 phosphoserine phosphatase (PSP)には少なくとも 2 タイプが存在し、それぞれ進化的に独立して生じたことを報告した。好熱性細菌 *Thermus thermophilus* はこれら 2 タイプどちらの PSP ホモログも有さない。しかし *T. thermophilus* は 1, 2 ステップ目の酵素遺伝子候補を有することから、既知のものとは異なる第 3 の PSP を有するのではないかと著者らは考えた。そこで本研究では、*T. thermophilus* が PSP を有するのかどうか、有するのであればそれが既知の PSP と進化的にどのような関係があるのか（あるいはないのか）を明らかにすることを目的とした。

【実験手法・結果】

T. thermophilus HB27 を sucrose を炭素源、$(NH_4)_2SO_4$ を窒素源とする完全合成培地で培養した。培養した菌体の可溶性画分を用いて活性測定を行ったところ、PSP を用いてセリンを生合成している既報の生物のそれと同等以上の PSP 活性が検出された。そこで本活性を有するタンパク質をカラムクロマトグラフィー法で精製し、LC-MS/MS 解析を用いて同定したところ、PSP 活性を有するタンパク質が、haloacid dehalogenase-like hydrase (HAD) superfamily に属する機能未知タンパク質であることが明らかとなった。組換え酵素を用いた性状解析の結果、このタンパク質は Mg^{2+} 依存的な PSP 活性を有し、phosphoserine に対して高い基質特異性を示した。すなわち *T. thermophilus* が第 3 の PSP を用いたセリン生合成経路を有することが強く示唆された。

【考察】

既報の 2 種類の PSP のうち片方は histidine phosphatase superfamily に、もう片方は *T. thermophilus* の PSP と同様に HAD superfamily に属する。しかし、HAD superfamily に属する既報の PSP と *T. thermophilus* の PSP 活性をもつタンパク質の 1 次配列は大きく異なる。したがって、様々な基質特異性を示す phosphatase を含む HAD superfamily において、両者は比較的早くに分岐し、それぞれ独立して phosphoserine に特化した phosphatase に進化したと考えられる。本研究で同定された PSP 活性を持つタンパク質を用いて *T. thermophilus* がセリンを生合成するとすれば、生物はセリン生合成酵素である PSP をこれまでに少なくとも 3 回「発明」したこととなる。

amino acid, novel enzyme, metabolism

発表責任者：千葉洋子（ychiba@jamstec.go.jp）

講演番号：3A25p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A25 会場

D-アミノ酸合成酵素のファンクショナルスクリーニング系の開発

Development of a functional screening system of D-amino acid synthetic enzymes

○武藤 菜摘、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Natsumi MUTO, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

近年の分析技術の進歩により、細菌のみならず植物や哺乳類など様々な生物の体内に D-アミノ酸が見出されてきた。これらの D-アミノ酸が生体内で多様な生理機能を担う例が報告されているが、生物種によってはその生合成機構が未だ解明されていない D-アミノ酸もある。本研究では、新奇 D-アミノ酸合成酵素の同定を目的としたファンクショナルスクリーニング系の開発に取り組んだ。

細胞壁ペプチドグリカンの構成成分として必須の D-グルタミン酸、D-アラニン合成を担う、グルタミン酸ラセマーゼ（*murI*）、アラニンラセマーゼ（*alr*、*dadX*）を欠損した大腸菌（MB3000 株）を作製した。MB3000 株は予想どおりその生育に D-グルタミン酸と D-アラニンの二つの D-アミノ酸を要求した。同株に、様々な D-アミノ酸とα-ケト酸をそれぞれアミノ基供与体と受容体に用いることができる Bacillus sp. YM-1 由来の D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（DAAT）を導入することで、菌体内で何らかの D-アミノ酸生成酵素が発現することで D-グルタミン酸、D-アラニン要求性が相補される菌株が作出されることを期待した。しかし、野生型 DAAT を導入した MB3000 株は D-アミノ酸非添加培地においても生育した。この原因は、DAAT が有する微弱なセリンラセマーゼ活性であると予想された。そこで野生型酵素に代わり活性部位近傍に点変異を導入した変異型 DAAT を用いたところ、D-アミノ酸添加培地でのみ生育する D-アミノ酸要求株が得られた。同株は、その生育に D-グルタミン酸と D-アラニンの両者を必要とはせず、そのどちらか一方、または D-セリン、D-アスパラギン酸、D-システイン、D-メチオニン、D-アスパラギンなど多様な D-アミノ酸の存在下で生育可能となった。得られたこの D-アミノ酸要求株に既知のアミノ酸ラセマーゼを発現させたところ、D-アミノ酸非添加培地における生育が確認された。この D-アミノ酸要求株を用いることで、D-アミノ酸合成酵素の活性検出や遺伝子クローニングが可能であると考えられる。現在は、構築した株を利用した新奇 D-アミノ酸合成酵素のスクリーニングに取り組んでいる。

D-amino acid, racemase, aminotransferase

講演番号：3A25p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A25 会場

D-セリンデヒドラターゼの基質となるヒト尿中未知アミノ酸の同定
Identification of a human urinary amino acid decomposed by D-serine dehydratase
○戸野 真由香、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Mayuka TONO, Tomokazu ITO, Hisashi Hemmi, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 D-セリンデヒドラターゼ（Dsd1p）は、ピリドキサールリン酸（PLP）及び Zn^{2+}に依存して D-セリンをピルビン酸とアンモニアへと分解する反応を触媒する。Dsd1p をヒト尿サンプルに作用させ、アミノ酸分析に供したところ、ここに Dsd1p によって異化される D-セリン以外の未知のアミノ酸が存在することが明らかとなった。このアミノ酸はヒト尿中にタンパク源性アミノ酸と同程度か、それ以上の濃度で存在していた。本研究では、この Dsd1p 基質アミノ酸の同定を行った。

ヒト尿より部分精製したこの未知アミノ酸は、様々な D-アミノ酸と反応性を示す D-アミノ酸オキシダーゼや D-アミノ酸トランスアミナーゼ(DAAT)によっては異化されなかった。このことから、当該アミノ酸は Dsd1p の基質になるにもかかわらず D-アミノ酸ではない可能性が考えられた。検討の結果、(i)当該アミノ酸の 6-aminoquinolyl-carbamyl（AQC）誘導体化物の質量電荷比が 319 で、当該アミノ酸の分子量が 148 であること、(ii) 当該アミノ酸の Dsd1p 処理によって生じるケト酸が、アスパラギンの脱アミノ化反応によって生じるケト酸と同一であること、さらに(iii)当該アミノ酸が大腸菌由来アスパラギナーゼ 1（AnsA）の基質となり、反応後に L-エリスロ-β-ヒドロキシアスパラギン酸を生じることなどが明らかとなり、当該アミノ酸が L-エリスロ-β-ヒドロキシアスパラギンであると結論づけられた。また、Dsd1p と HPLC を用いてラットやマウスの大脳、小脳、精巣、血漿、尿における当該アミノ酸の分布を検討したところ、尿においては当該アミノ酸が著量存在していたが、その他の組織では検出されなかった。

D-seriine dehydratase, pyridoxal 5'-phosphate, hydroxyasparagine

講演番号：3A25p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A25 会場

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* のホモクエン酸合成酵素の構造・機能及びフィードバック阻害機構の解析
Mechanism for feedback regulation of homocitrate synthase (HCS) in lysine biosynthesis of *Sulfolobus acidocaldarius*
○鈴木 智大、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生セ）
○Tomohiro SUZUKI, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, Tokyo Univ.)

《背景・目的》超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* は α-アミノアジピン酸(AAA)を中間体とする AAA 経路によってリジンを生合成する。リジン生合成の後半部を担う酵素遺伝子がクラスターを形成する一方で前半部を担う酵素遺伝子候補はゲノム上に散在しており、各遺伝子の機能と発現制御機構ならびに遺伝子がコードする酵素の活性制御機構は不明であった。これまでに我々は Saci_1304 (SaHCS) がリジン生合成の初発酵素であるホモクエン酸合成酵素 (HCS) であることが明らかにした。HCS はα-ケトグルタル酸(α-KG)に対しアセチル CoA のアセチル基を縮合させることによりホモクエン酸を生成する既知の HCS はリジンがα-KG 結合サイトに結合する競合阻害によって制御されるが、SaHCS では既知の HCS 間で保存されているリジンを認識する残基が保存されていない。その代わりに SaHCS の C 末端側には RAM (Regulation of Amino acid Metabolism) ドメインが存在している。RAM ドメインは Lrp (leucine responsive regulatory protein) 転写制御因子ファミリーのアミノ酸結合ドメインとして知られている。このことから SaHCS は RAM ドメインを介してリジンによる阻害を受ける可能性が示唆された。本研究では *Sulfolobus* 属由来の HCS の結晶構造解析及びフィードバック阻害機構の解明を目的としている。
《結果・展望》機能解析に足る量の SaHCS が調製できなかったため、*S. tokodaii* 由来の HCS オルソログ (StHCS)を用いて実験を行なった。StHCS はリジンにより V-type の阻害を受ける一方で、RAM ドメイン欠失体 StHCS (ΔRAM) は阻害を受けなかった。この結果は酵素の活性制御に RAM ドメインが利用されていることを示す初めての例となった。次に、ゲル濾過による分子量解析を行ったところ StHCS は 4 量体であったが、リジン存在下で 8 もしくは 16 量体に変化した。一方で StHCS (ΔRAM)はリジンの有無に関わらず 2 量体として存在していた。このことから RAM ドメインは 2 つの HCS ダイマーを会合させ、リジン存在下ではさらにそれらを会合させていることにより酵素の活性調節を行なっていることが明らかとなった。また、アセチル CoA 及びα-KG 存在下で SaHCS (ΔRAM) の結晶構造解析を行った結果、α-KG は既知の HCS と似た様式で認識される一方、CoA の認識には触媒ドメインと RAM ドメインをつなぐリンカードメイン中のサブドメイン II が関与していることを初めて明らかにした。

homocitrate synthase, RAM domain, *Sulfolobus*

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A25p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A25 会場

D-リジン異化代謝オペロン転写因子 DlcR の分子機構の解析
Mechanism of the transcription factor DlcR regulating a D-lysine catabolic operon in *Pseudomonas putida*
○黒石 和樹、太田 昌希、佐藤 大起、戸部 隆太、三原 久明（立命館大）
○Kazuki KUROISHI, Masaki OTA, Taiki SATO, Ryuta TOBE, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】 *Pseudomonas putida* KT2440 は、D-リジン異化代謝系を有しており、D-リジンを唯一の C 源・N 源とする培地で良好に生育できる。本菌における D-リジン異化代謝酵素である D-リジンデヒドロゲナーゼ (PP3596, AmaD) は、D-リジンから Δ^1-ピペリデイン-2-カルボン酸への変換を触媒する。*amaD* は、隣接する 5 つの遺伝子 (*PP3592-PP3597*) とオペロン (*dlc* オペロン) を構成している。我々は、これまでの研究により、*PP3593-PP3595*、*PP3597* が塩基性 D-アミノ酸特異的なインポーターをコードすることを明らかにしている。本オペロンの最上流に位置する *PP3592* (*dlcR*) 遺伝子は、RpiR ファミリーに属する転写制御因子をコードする。*dlcR* 遺伝子欠損株を用いた解析により、DlcR が *dlc* オペロンのリプレッサーとして機能すること、また、*dlc* オペロンの発現抑制は D-または L-リジンの培地への添加により解除されることが示唆されている。そこで本研究では、DlcR に対する塩基性アミノ酸の結合特性を解析することにより、DlcR を介する *dlc* オペロンの転写制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【結果・考察】 *P. putida* KT2440 株由来の *dlcR* 遺伝子を大腸菌にクローニングし、組換えタンパク質として DlcR を精製した。DlcR が結合する DNA 領域を特定するために、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、DlcR は本遺伝子上流部に位置する推定パリンドロームを含む DNA 断片 (169 bp) に特異的に結合することが示された。また、DlcR の DNA への結合は、D-リジンおよび D-アルギニン、D-オルニチン存在下で解除され、D-アラニン、D-ヒスチジンや L-リジンでは解除されないことを見出した。D-リジンおよび D-アルギニンに対する DlcR の親和性を明らかにするため、本精製タンパク質を用いたトリプトファン蛍光法により、それぞれの解離定数 (K_D) を算出した。その結果、D-リジン、D-アルギニンの順に親和性が高いことが明らかになった。また、L-リジンおよび D-アラニンでは、蛍光スペクトルに変化は見られなかった。以上の結果から、DlcR は、D-リジン、D-アルギニン、D-オルニチンをインデューサー分子として機能する *dlc* オペロンのリプレッサーであることが示された。一方、D-リジン、D-アルギニンまたは D-オルニチンを C 源・N 源とした培地において、*dlc* オペロンの発現抑制が解除されているにも関わらず、*dlcR* 遺伝子欠損株の生育は野生株に比べて著しく遅延することを見出した。AmaD は D-リジン、D-オルニチンにより基質阻害を受けることが分かっていることから、塩基性 D-アミノ酸培地における *dlcR* 欠損株の生育遅延には、細胞内塩基性 D-アミノ酸濃度の増加に伴う AmaD 活性の低下が関与する可能性が考えられた。

D-amino acid, transcriptional regulator, ABC transporter

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3A25p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A25 会場

E. coli ビタミン B_6 結合タンパク質 YggS と *glyA* との合成致死性の要因

Molecular basis of the synthetic lethality of *yggS* and *glyA* mutations in *E. coli*

○堀 蘭、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹（名古屋大生命農）
○Ran HORI, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

Escherichia coli 由来 YggS はピリドキサール 5’ リン酸（PLP）を結合した機能未知のタンパク質であり、バクテリアからヒト、植物、酵母に至る様々な生物で高度に保存されている。この高度な保存性から、YggS が生体内において何らかの重要な機能を有していることが示唆される。現在までの研究で、*E. coli yggS* 欠損株が 2-aminobutyrate (2-AB)、2-ketobutyrate (2-KB)、そして、オフタルミン酸（γ-Glu-2-AB-Gly）を蓄積することが示されている。また、PLP の前駆体であるピリドキシン 5’ リン酸（PNP）を蓄積し、ピリドキシン（PN）に対して感受性であることが報告されている。また、*yggS* ヒトホモログである *PROSC* 遺伝子が PN 依存性癲癇の原因遺伝子として同定された。別の研究では、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ（*glyA*）遺伝子と *yggS* 遺伝子が致死性ペアであることが示唆された。このように、*yggS* 欠損のフェノタイプについては多くの報告があるが、現在のところ、YggS やそのホモログタンパク質の機能は同定されていない。本研究では *glyA* と *yggS* の合成致死性の要因解明を目指した。*glyAyggS* 二重欠損株の作製を試みたところ、同株は取得可能であり、二重欠損株の生育が顕著に遅いことが明らかとなった。生体内において GlyA は Ser と tetrahydrofolate (THF) から Gly と 5,10-metylene-tetrahydrofolate (5,10-mTHF)を生成する相互変換を触媒する。*glyAyggS* 二重欠損株の生育は、その生合成に 5,10-mTHF を要求する化合物群（チミジン、パントテン酸、Met、イノシン）の培地への添加によって回復した。*glyA* 欠損時には、5,10-mTHF はグリシン開裂系（GCV）によって供給されていると予想され、YggS と GCV の関連性が示唆された。そこで、3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ（*serA*）欠損株が Gly 存在下で 5,10-mTHF の供給を GCV に依存することを利用して、GCV と YggS の関連を検証した。*serA* 欠損株と *serAyggS* 二重欠損株の生育は Ser 存在下では同一であったが、Gly 存在下では顕著に遅延した。また Ser Gly 共存下では生育遅延は認められなかった。また Gly 存在下での生育遅延は、チミジン、パントテン酸、Met、イノシンの添加によって回復した。以上の結果から、*yggS* 欠損により GCV 活性が減弱する可能性が示唆された。

pyridoxal 5-phosphate, glycine cleavage system, serine hydroxymethyltransferase

講演番号：3A25p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A25 会場

Geobacillus kaustophilus 由来ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素の機能解析
Functional analysis of diaminopimelate decarboxylase from *Geobacillus kaustophilus*
○大森 勇門[1]、張 世文[1]、米田 一成[2]、大島 敏久[1] ([1]大阪工大工、[2]東海大農)
○Taketo Ohmori[1], Semun Chang[1], Kazunari Yoneda[2], Toshihisa Ohshima[1] ([1]Osaka Inst. Tech., [2]Tokai Univ.)

[目的]　ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素(DAPDC)は、*meso*-ジアミノピメリン酸(*meso*-DAP)から L-Lys と CO_2 を生成する反応を触媒する酵素で、細菌における Lys 生合成系の一つ、DAP 経路の最終ステップを触媒する酵素である。本酵素は、*meso*-DAP の D 型不斉炭素に結合したカルボキシル基の脱炭酸反応のみを触媒することから、D-アミノ酸を基質とする脱炭酸酵素であると言える。しかしその基質特異性は高く、*meso*-DAP 以外の化合物は基質とならない。我々は本酵素の機能と構造解析を行い、基質の L 型不斉中心を認識するアミノ酸残基への変異導入により、新しい特異性を有する D-アミノ酸脱炭酸酵素の創製とその応用を目指している。本研究では安定性の優れた DAPDC として、*Geobacillus kaustophilus* 由来の DAPDC を対象に、その生産と酵素学的特徴を明らかにした。また DAPDC の酵素活性を、好熱菌由来の NAD 依存性 L-Lys 6-脱水素酵素(LysDH)を用いて分光学的に測定する新たな測定法の開発も行った。
[方法]*G. kaustophilus* 由来の DAPDC (GK2300) 遺伝子を PCR にて増幅後、pET19b に挿入した。調製したプラスミドを用いて、*Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS を形質転換することで大量発現系を構築した。発現酵素の精製は、熱処理(65˚C, 30 min)と Ni キレートカラムに供することで行った。DAPDC の酵素活性測定は、*G. stearothermophilus* 由来の LysDH (Heydari M. *et al*, Appl. Environ. Microbiol., 2004)、m-PMS、WST-1 を用いて分光学的に測定する方法にて行った。
[結果と考察]
大腸菌にて大量発現させた DAPDC は、熱処理と Ni キレートカラムにより簡便かつ均一に精製することができた。*G. kaustophilus* 由来の DAPDC は熱処理により酵素活性が増大したことから、大腸菌で発現させた場合、熱により活性をもつコンフォメーションに変化する可能性が示唆された。本酵素反応の最適温度は 60˚C、最適 pH は 8.0 であった。現在、動力学的性質の解析を進めている。また本酵素活性の測定法として、基質 *meso*-DAP から生成する L-Lys を、 NAD 依存性 LysDH により酸化、生じた NADH より m-PMS を介してテトラゾリウム塩である WST-1 を還元する、共役反応系を用いた新規な分光学的測定法を開発した。本法では好熱菌由来の酵素を使用しているため再現性に優れ、また分光光度計で簡便かつ高感度に DAPDC 活性を測定することができる。さらに DAPDC の酵素活性測定だけでなく、*meso*-DAP の定量にも応用できる優れた分析法である。

diaminopimelate decarboxylase, L-Lysine 6-dehydrogenase, Thermophile

講演番号：3A25p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A25 会場

Pseudomonas fluorescens SBW25 株のピラジン生合成経路
Pyrazine synthesis pathway of *Pseudomonas fluorescens* SBW25
○桝尾 俊介、生井 智仁、津田 祐介、高谷 直樹（筑波大生命環境系）
○Shunsuke Masuo, Tomohito Namai, Yusuke Tsuda, Naoki Takaya (University of Tsukuba)

【背景と目的】ピラジン化合物は医薬・化成品の原料となる重要な化合物であり、多様な類縁体が天然に見出されるものの、その生合成機構の多くは未解明である。近年、我々は *Pseudomonas fluorescens* SBW25 株の遺伝子クラスター*pfpapABCDEF* がピラジン化合物である 2,5-ジメチル-3,6-ビス(4-アミノベンジル)ピラジン(DMBAP)の生合成に関与することを見出した。これまでに、*pfpapABCDEF* 発現大腸菌の代謝産物の解析等から、4-アミノフェニルアラニン (4APhe) および 3-アミノ-4-(4-アミノフェニル)-2-ブタノン (APB) が DMBAP の生合成中間体であること、*pfpapABC* がコリスミ酸からの 4APhe 生合成に関わることを明らかとしている。本研究では、*pfpapDEF* がコードし、4APhe の DMBAP への変換に関与すると予想された 3 つの酵素の機能を解析し、その生合成機構を解明することを目的とする。
【結果と考察】*pfpapABCD* 発現大腸菌は APB を生産するが、*pfpapABC* のそれは 4APhe を生産するものの APB は生産しないことから、*Pf*PapD は 4APhe を APB に変換する酵素であると予想された。組換え *Pf*PapD を 4APhe およびアセチル CoA の存在下でインキュベートし、その反応液を HPLC および LC-MS/MS 分析したところ、4APhe およびアセチル CoA の減少と APB の生成が確認された。*Pf*PapD は、脱炭酸とともに、4-APhe にアセチル CoA のアセチル基を転移することで、APB を生じる反応を触媒していることが明らかとなった。*Pf*PapD の 4APhe およびアセチル CoA に対する Km 値と Vmax 値は、それぞれ 0.59 mM、 0.23 μmol min^{-1} mg^{-1} および 0.66 mM、0.55 μmol min^{-1} mg^{-1} であった。*Pf*PapE のアミノ酸配列はメチル基転移酵素と相同性を示す。組換え *Pf*PapE を DMBAP を基質、S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル供与体として反応させたところ、DMBAP が減少しアミノ基がメチル化された Me-DMBAP が生成した。また、*pfpapABCDEF* 発現大腸菌の代謝産物中にも Me-DMBAP が検出された。*Pf*PapE は SAM 依存性の DMBAP メチル基転移酵素であることが示された。*Pf*PapF のアミノ酸配列はグリシン酸化酵素と相同性を示す。組換え *Pf*PapF を用いた各種解析から、本酵素が酸素を電子受容体としたグリシンの酸化反応を触媒することが示された。さらに、*Pf*PapF は培養液から精製した APB に対しても活性を有していた。以上のことから、*Pf*PapABC により生合成された 4APhe は、*Pf*PapD により APB へと変換され、*Pf*PapF が関与する APB の酸化・縮合あるいは縮合・酸化を経て DMBAP が生成し、*Pf*PapE により Me-DMBAP が生合成されることが明らかとなった。

pyrazine, amino acid, *Pseudomonas fluorescens*

発表責任者：桝尾俊介（ma_shun7775@hotmail.com）

講演番号：3A25p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A25 会場

L-メチオニン γ-リアーゼから作成した基質特異性改変酵素の性質と構造解析
Characterization and structural analysis of substrate specificity modifed enzyme made from L-methionine γ -lyase
○半田 暖尚[1]、安田 江里[1]、室田 昌輝[2]、湯之戸 俊介[2]、佐藤 暖[2]、志波 智生[2]、原田 繁春[2]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]京工繊大院・工芸科学)
○Haruhisa HANDA[1], Eri YASUDA[1], Masaki MUROTA[2], Shunsuke YUNOTO[2], Dan SATOU[2], Tomoo SHIBA[2], Shigeharu HARADA[2], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Okayama Univ., [2]Kyoto Inst. Technol.)

【目的】L-メチオニン γ-リアーゼ(MGL)は補酵素としてピリドキサール 5'リン酸(PLP)を有する多機能酵素で， L-メチオニン(L-Met) とその誘導体の α，γ-脱離反応，L-システイン(L-Cys) とその誘導体の α，β-脱離反応等を触媒する。中でも L-Met と共に L-ホモシステイン(L-Hcy)を良い基質とする。本研究室では, *Pseudomonas putida* 由来 MGL の活性中心に存在するアミノ酸残基の機能解析及び基質特異性の改変を行ってきた。MGL および MGL_C116H 変異酵素（L-Cys への活性が大きく増加した変異酵素）と基質の複合体の X 線結晶構造解析の結果から Gln349 残基が L-Met との相互作用において重要な残基であることが示唆された。そこで, Gln349 残基を Ala に置換した MGL_Q349A 変異酵素を作製したところ， L-Met に対する活性が大きく減少する一方で L-Hcy に対する活性は維持していた。そのため,この Gln349 残基に変異を導入し, 新たに 10 種類の MGL 変異酵素を作製した。その結果, 野生型 MGL と比較して L-Hcy に対する活性が増加し L-Met に対する活性は減少した Q349S 変異 MGL を得ることができた。そこで，Q349S 変異 MGL の特性を解明することを目的として,精製酵素の性質検討とリガンドフリー及び酵素・基質（L-Met, L-Hcy）複合体の X 線結晶構造解析を行った。
【方法】活性測定は, MBTH 法により生成する α-ケト酸の量を測定することで行った。変異酵素の作製は部位特異的変異導入法によって行った。X 線回折強度測定はシンクロトロン放射光ビームライン：KEK-PF BL17A, SPring-8 BL44XU で行い, 構造解析は野生型のリガンドフリーの構造をモデル分子として用いた分子置換法で行った。【結果】 Q349S 変異 MGL と基質（L-Met, L-Hcy）の複合体の X 線結晶構造解析から， Thr355 が Ser349 と水素結合が形成できないことがわかった。そのため, Thr355 の側鎖が回転して, PLP-Met 中間体のカルボキシ基との間で水素結合を形成していた。また, L-Met を基質に用いたときは, Asn161 と PLP-中間体のカルボキシ基が水素結合を形成せず， L-Hcy を基質に用いた時は, Asn161 と PLP-中間体のカルボキシ基が水素結合を形成することが分かった。一方, 野生型 MGL では, Thr355 が Gln349 と水素結合を形成しているため PLP-中間体から離れた位置にあり, Thr355 と PLP-中間体のカルボキシ基の間に水素結合は形成されていないことがわかっている。よって, Q349S 変異 MGL と基質（L-Hcy）の複合体では PLP-Hcy と酵素タンパク質との間の水素結合が多く形成されるため, 反応中間体と酵素タンパク質の相互作用が最も強いので, 野生型 MGL と比較して L-Hcy に対する活性が増加したと考えられる。

L-methionine γ -lyase, substrate specificity, crystal structure

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3A26a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A26 会場

イネ由来α－アミラーゼの触媒反応機構に対する構造的洞察

Structural insight into the catalytic mechanism of rice-derived α-amylase

○落合 秋人、菅井 寛、田中 孝明、谷口 正之、三ツ井 敏明 (新潟大・自然研)
○ Akihito OCHIAI, Hiroshi SUGAI, Takaaki TANAKA, Masayuki TANIGUCHI, Toshiaki MITSUI (Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】イネ由来の α-アミラーゼ AmyI-1 は、Glycoside hydrolase (GH)ファミリー13 に属し、様々な組織や成長段階において重要な役割を担っている。また、AmyI-1 は *N*結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であり、この特徴は植物アミラーゼのなかでも AmyI-1 に固有の特徴である。当研究グループでは、これまでに野生型 AmyI-1 のＸ線結晶構造を決定した [1)]。AmyI-1 は GH ファミリー13 に共通した $(\beta/\alpha)_8$-barrel 構造を基本骨格に有し、さらに C 末端側に付加的な β-sheet ドメインを持っていた。今回、デンプンのアナログ基質である Acarbose との複合体の立体構造を解析し、AmyI-1 の基質結合メカニズムと反応機構について考察した。

【方法と結果】大腸菌発現系を用いて、AmyI-1 の組換えタンパク質を調製した。発現ベクターおよび宿主として、それぞれ pET21b と *Escherichia coli* HMS174(DE3)株を使用した。発現・精製した AmyI-1 を、Polyethylene glycol 3350 を沈殿剤として含む条件において結晶化し、この結晶に Acarbose をソーキングすることにより AmyI-1/Acarbose 複合体の結晶を調製した。Ｘ線回折実験は大型放射光施設(Photon Factory)において行い、結晶構造を 2.0Å 分解能において決定した。アポ型と複合体の全体構造において、両者に有意な構造変化は認められなかった。ソーキングした Acarbose は活性中心および 2 カ所の分子表面に結合していた。これらのうち、分子表面の 2 カ所は Surface Binding Site (SBS)と呼ばれ、イネにおいてプラスチドへの移送に関与する可能性を過去に報告している [1)]。GH ファミリー13 に属する α-アミラーゼの活性中心においては、その加水分解活性に重要な 3 つのアミノ酸残基“Asp-Glu-Asp”が高度に保存されている。AmyI-1 においては Asp-203, Glu-228, および Asp-314 が対応するが、それらの残基をまたぐように、サブサイト-2, -1, +1, +2 に 1 分子の Acarbose が結合していた。“Asp-Glu-Asp”の各残基におけるアラニン変異体は活性を失うことから、それら残基の AmyI-1 における役割は GH ファミリー13 に属する他の酵素のものと同様であり、Glu-228 が酸触媒として機能すると考えられた。また、各サブサイトにおける糖の認識には、十数個のアミノ酸残基が関与していたが、特に Trp-34, Tyr-76, Phe-167, Phe-204, Trp-230 からなる芳香族アミノ酸の疎水結合が重要であることが示唆された。

1) A. Ochiai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 989-997 (2014)
2) A. Kitajima *et al.*, *Plant Cell,* 21, 2844-2858 (2009)

α-amylase, starch degradation, rice

発表責任者：落合秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A26a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A26 会場

非凍結結晶を用いたβ－アミラーゼ（E380A）と基質との複合体の pH 変化の解析
Crystallographic analysis of pH dependency of β-amylase(E380A)/substrate complex with capillary crystals
○三上 文三[1]、安達 基泰[2]、姜 有那[1]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1]([1]京大農、[2]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1], Motoyasu Adachi[2], Youna Kang[1], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】ダイズ β－アミラーゼの活性中心付近には酸、塩基触媒残基である二つの Glu 残基（Glu186 と Glu380）の他に、最大 11Å 移動する 9 残基のフレキシブルループと、主鎖の構造がアポ型からプロダクト型に切り換わる 5 残基のインナーループの二つの可動ループ、およびアポ型と基質複合体で側鎖の構造が変化する Lys295 が存在する。本酵素の生成物であるマルトースはサブサイト-2～-1 と +1～+2 に連続して 2 分子が結合するが、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪むことが知られている。今回は、実際の基質とβ-アミラーゼとの相互作用を結晶内で解析するために、キャピラリーを用いて非凍結状態で結晶回折データの測定を行い、塩基触媒残基の変異体である E380A の構造について、基質であるマルトペンタオース（G5）との結合の濃度依存性と pH 依存性について検討した。
【方法】ダイズβ - アミラーゼの E380A 変異体の三方晶の結晶は pH 5.4、42%飽和硫安溶液中でハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製した。得られた結晶は pH 3.2～8.7 に調整した 40 mM G5 を含む母液に 5 分間ソーキングした後に、ガラスキャピラリー中に封じ、SPring-8 のビームライン BL26B1 において室温でＸ線回折データの収集を行った。一部のデータは pH を固定し、G5 の濃度を 0～40 mM で変化させた。構造の精密化の計算には主に SHELXL を、モデリングには COOT を使用した。
【結果】非凍結状態での回析データの収集は分解能 1.66～1.95 Åで行った。すべての pH において G5 はダイズβ - アミラーゼの -2～+3 のサブサイトに連続して結合し、G5 の結合によってフレキシブルループはオープン型からクローズド型に変化するが、インナーループは常にアポ型であった。また、Lys295 の側鎖はアポ酵素でも既に複合体型に変化していた。pH 5.6 で G5 の占有率から求めた *K*d の値は 01～0.2 mM程度であった。pH を変化させると、pH 8 以上で、サブサイト-1 と+1 の結合位置に 1～2Åの変化が認められた。この構造変化には変異をいれていない酸触媒残基である Glu186 の解離が影響していると推定された。以上の結果から、Glu380 の側鎖は塩基触媒として作用するのみならずインナーループと Lys295 の側鎖の構造変化にも重要であることが明らかになった。

β-amylase, structure analysis, X-ray analysis

発表責任者：三上文三（mikami@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A26a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A26 会場

Paenibacillus polymyxa 由来 β-アミラーゼの Ser161 および Trp175 の機能解析
Functional analysis of Ser161 and Trp175 of *Paenibacillus polymyxa* β-amylase

○肥垣津 雄日[1]、多田 俊治[2]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1]、乾 隆[1]、西村 重徳[1]([1]阪府大院・生環科、[2]阪府大院・理)
○Yuhi KOEGAITSU[1], Toshiji TADA[2], Junichi SUMITANI[1], Takashi KAWAGUCHI[1], Takashi INUI[1], Shigenori NISHIMURA[1] ([1]Grad. sch Life & Envi. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. sch Bio. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景および目的】β-アミラーゼはでんぷんやアミロース等を基質とし，その非還元末端から 2 番目のα-1,4 グルコシド結合を加水分解してβ-マルトースを遊離するアノマー反転型のエキソ型酵素である。*Paenibacillus polymyxa* 由来β-アミラーゼ(PPB)は同じ *Bacillus* 科に分類される *Bacillus cereus* 由来β-アミラーゼ（BCB）と 54%の相同性を有する一方で，アミロース加水分解の K_m，および k_0 は BCB の約 10 分の 1 の値を示し，これらの値はむしろ，35%の相同性を有する大豆由来β-アミラーゼに近い。このような反応速度パラメータの違いを立体構造に基づいて説明するために， PPB の反応座標に沿った様々な状態での三次元構造を解析している。本発表では，PPB の活性欠失変異体 E163A および E359A と基質であるマルトペンタオース（G5）との複合体（E163A/G5,および E359A/G5）の立体構造を報告する。さらに，PPB および BCB 基質複合体において基質との相互作用が異なるアミノ酸残基に変異を導入し，その機能を酵素化学的に調べた。

【方法および結果】実験には，大腸菌発現系において発現，精製した酵素を用いた。各酵素を基質共存下で結晶化し，SPring-8 BL38B1 において X 線回折データの収集を行い，分解能 1.38～1.60 Å までのデータを用いて立体構造を決定した。

E163A/G5，および E359A/G5 では，基質が触媒部位であるサブサイト-1～+1 を跨いで加水分解されずに結合していたことから，反応座標における ES 複合体に相当すると考えられる。

両複合体において，基質の結合に伴い，フレキシブルループ（Gly85～Asp89）は，他のβ-アミラーゼと同様,オープン型からクローズ型に変化していた。PPB と基質との相互作用を BCB と比較した結果，サブサイト+1，および+2 において PPB の Ser161，および Trp175 と基質との相互作用の様式が BCB と異なっていた。Ser161，および Trp175 をそれぞれ BCB のアミノ酸残基に相当する Ala，および Thr に置換した変異体 S161A,W175A を作製し酵素活性を測定した。その結果，S161A の K_m，および k_0 値は WT と比較して，それぞれ 3.6，および 1.7 倍上昇し，BCB の反応速度パラメータに近づいた。一方，W175T の至適 pH は PPB の至適 pH である pH7.5 から pH5.0 に低下し，最大活性の値は WT の約 10 分の 1 に低下していた。Trp175 は近傍の Tyr169 の配向を制限しており，さらに Tyr169 は酸触媒残基である Glu163 と相互作用している。このように Trp175 は基質と相互作用するだけでなく，触媒部位の静電的な環境を調節し酸触媒の pK_a を上昇させていると考えられる。

β-amylase, X-ray crystallography, Enzyme mechanism

発表責任者：肥垣津 雄日（sv202013@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A26a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A26 会場

ミミズが有する血栓分解酵素及び各種糖質加水分解酵素の発現条件の検討

Expression condition analysis of fibrinolytic and various saccharification enzymes of earthworms

○櫻井 悠貴[1]、中島 優一[1]、赤澤 真一[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2] ([1]長岡高専物質工、[2]長岡技科大生物)
○Yuki SAKURAI[1], Yuichi NAKAJIMA[1], Shin-ichi AKAZAWA[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2] ([1]Dept. Mat. Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll., [2]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】今日の食生活の欧米化に伴い血栓症患者数の増加が問題となっている．そこで我々は，これまで強力な血栓分解酵素（ルンブルキナーゼ）を有するミミズを用いた健康食品を開発し[1)]，予防医療に用いる事を目指してきた．さらに，ミミズは強力な消化系酵素（アミラーゼ，エンドグルカナーゼ等）も有しており[2)]，酵素活性をコントロールできれば胃腸薬のような付加価値をもった健康食品も開発出来る．また，酵素活性の調節に食品廃棄物を餌として用いることで，廃棄物処理にも同時に貢献しうる．これらの実現には高い酵素活性が必要不可欠であるが，これら機能性酵素群の発現条件は未だ明らかになっていない．本研究では，各種酵素の最適誘導条件の確立に向けた研究の一環として，基質として実バイオマスを添加した OECD 培地を用いて，ミミズの酵素誘導培養を行い，酵素活性測定とリアルタイム PCR で各種酵素遺伝子の発現量の推移について検討する事を目的とした．
【方法】24 h 絶食したミミズ（*Eisenia fetida*）を飢餓条件，ゼラチン，コーヒーかすの基質を含む OECD 培地でミミズを 1 週間飼育し，誘導効果について検討した．誘導したミミズは 0，1，3，5，7 日に 20 匹ずつ破砕を行った．破砕粉末から粗酵素液を調整し，ルンブルキナーゼ，α-アミラーゼ，エンドグルカナーゼ，β-グルコシダーゼの比活性を測定した．また，破砕粉末から RNA 抽出を行い，cDNA 合成を行った後リアルタイム PCR を用いて，ルンブルキナーゼ（*EfFIII1*），α-アミラーゼ（*EfAMY1*），エンドグルカナーゼ（*EfEG1*），β-グルコシダーゼ（*EfBGL*）について発現量の測定を行った．また，コントロール遺伝子としてアクチン（*EfACT*）を用いた．
【結果・考察】飢餓条件では，誘導期間中に各遺伝子発現量の向上が見られたが比活性の向上は見られなかった．基質としてゼラチンを用いた場合，各種遺伝子発現量と比活性の相関が見られ，エンドグルカナーゼでは誘導 7 日目に比活性が 1.6 倍に向上した．コーヒーかすを用いた場合，ルンブルキナーゼは誘導 5 日目に比活性が 1.8 倍，エンドグルカナーゼは経時変化と共に顕著に比活性が向上し，誘導 7 日目に 5.3 倍に比活性が向上した．しかしながら，両遺伝子共に比活性と発現量の相関は見られなかった．コーヒーかすはタンパク質と豊富な食物繊維を含むため，プロテアーゼであるルンブルキナーゼ活性とセルラーゼの 1 種であるエンドグルカナーゼ活性が向上したと考えられた．以上のことからルンブルキナーゼとエンドグルカナーゼを誘導する基質としてコーヒーかすが有用である可能性が示唆された．

[1]赤澤真一，脇本真之介，渡邉俊則．特許番号 I 491397（台湾）．特許番号 9089581（米国）．
[2]Akazawa, S., *et al*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80(1):55-66 (2016).

Eisenia fetida, Lumbrokinas, Cellulase

発表責任者：赤澤　真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：3A26a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A26 会場

Thermotoga maritima 由来耐熱性ホスホヘキソムターゼの活性の解析
Analysis of the activity of thermostable phosphohexomutase from *Thermotoga maritima*.
○中澤 篤志[1]、佐分利 亘[1]、森 春英[1]、吉田 靖彦[2]、福井 健介[3]、伊吹 昌久[2]、津村 和伸[3]([1]北大院農、[2]不二製油株式会社、[3]不二製油グループ本社株式会社)
○Atsushi NAKAZAWA[1], Wataru SABURI[1], Haruhide MORI[1], Yasuhiko YOSHIDA[2], Kensuke FUKUI[3], Masahisa IBUKI[2], Kazunobu TSUMURA[3] ([1]Hokkaido Grad., [2]FUJI OIL CO.,LTD., [3]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

【目的】　好熱性嫌気細菌 *Thermotoga maritima* における β-(1→4)-マンノオリゴ糖の代謝には, β-1, 4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ TmMOP (TM1225) が関与すると考えられており, 加リン酸分解産物 α-マンノース 1-リン酸 (α-Man1*P*) はホスホマンノムターゼ (PMM) によりマンノース 6-リン酸 (Man6*P*) に変換されて代謝されると予想される．現在 PMM 関連酵素は α-D-ホスホヘキソムターゼスーパーファミリーとして主に 4 サブファミリーに分類される．すなわちホスホグルコムターゼ (PGM), PMM/PGM, ホスホグルコサミンムターゼ (PNGM), およびホスホアセチルグルコサミンムターゼの 4 群である．これらの基質特異性は糖結合ループ上の特異的残基に依るとされる．*T. maritima* にはゲノム配列より, PMM 関連酵素として TM0184 と TM0769 が推定される. TM0184 は配列に基づき PNGM と予測されるのに対し, TM0769 は主要 4 サブファミリーいずれとも配列上異なっており, ヒト由来グルコース 1, 6-ビスリン酸シンターゼやホスホペントムターゼ等とともに独立したクラスターを形成する．本研究は, 同酵素群に属す最初の細菌由来酵素として TM0769 タンパク質の機能解析を行った．

【結果・考察】　組換え TM0769 を大腸菌 BL21 (DE3) 形質転換体により生産し, Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより培養液 1 L の無細胞抽出液から精製標品 9.84 mg を調製した．本酵素の分子質量は, SDS-PAGE により 53.6 kDa, 非変性 Blue Native-PAGE により 106.5 kDa と見積もられ, 従って本酵素は他の PMM 関連酵素同様にホモ二量体と判断された．TM0769 は α-Man1*P* および α-Glc1*P* を基質として, それぞれ Man6*P* および Glc6*P* を生成した．すなわち, PMM/PGM の両活性を示した. TM0769 は pH 4.2–11.0 の範囲 (4°C, 24 h) および 70°C まで (pH 6.5, 15 min) 安定であった. また本酵素の PGM 活性は 70°C, pH 6.4 で最大値を示した．本酵素の活性は, 1 mM EDTA 添加により未処理時の 0.66%まで低下した．これに 2 mM $MgCl_2$, $CoCl_2$, $MnCl_2$ および $NiCl_2$ を加えると未処理時の 67.2%, 446%, 418%, 156%の活性を示した．PMM 関連ファミリー酵素の多くは活性に Mg^{2+}を特異的に必要とし, Mg^{2+}以外の 2 価カチオン要求性はほとんど見られていない．以上, TM0769 が PMM/PGM 活性を有すことが確認されたことから, 本酵素がマンノオリゴ糖代謝において TmMOP の下流を司る可能性が示された．

Thermotoga maritima, phosphohexosmutase, Alpha-D-phosphohexomutase superfamily

講演番号：3A26a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A26 会場

好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース生成型 β-アガラーゼの精製と酵素的諸性質の検討および遺伝子の同定

Purification, Characterization and Gene Identification of the β-Agarase Releasing Neoagarobiose from Agarose, Produced by an Alkalophilic Bacterium *Cellvibrio* sp. WU-0601

○樫村 佳奈、岡本 真歩、石井 義孝、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Kana KASHIMURA, Maho OKAMOTO, Yoshitaka ISHII, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

β-アガラーゼ (EC 3.2.1.81) は、寒天の主成分であるアガロースのβ-1,4 結合を特異的に切断しネオアガロオリゴ糖を生産する酵素として知られている。演者らは、土壌よりアガロースを唯一の炭素源として生育する好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 を単離し、細胞内にネオアガロオリゴ糖、とくにネオアガロビオース (NA2) の加水分解活性を示す酵素としてα-neoagarooligosaccharide hydrolase (EC 3.2.1.159) の存在を明らかにした[1]。さらに、 酵素的諸性質を決定し、遺伝子を同定した[1]。一方、細胞内に取り込んだネオアガロオリゴ糖を分解する酵素が存在すると予想して、ネオアガロテトラオース (NA4) やネオアガロヘキサオース (NA6) を分解する酵素を探索したところ、細胞内にこれらを NA2 にまで分解する新規なβ-アガラーゼ (AgaX) を見出した。NA2 は保湿性や美白作用を示す化合物として特徴があり[2]、これを選択的に生産可能な本酵素は極めて有用と考えた。そこで、AgaX の諸性質を検討し、遺伝子のクローニングと大腸菌における高発現を行った。

【方法および結果】

NA4 を基質として使用し、WU-0601 株の無細胞抽出液から 4 段階の工程を経て、SDS-PAGE で単一バンドを示すまで AgaX を精製した。AgaX 比活性は 36 倍に増大した。精製した AgaX の分子量は SDS-PAGE で約 86 kDa、ゲル濾過クロマトグラフィーで 90 kDa であったことから、当該酵素は単量体と考えられる。精製酵素の N 末端アミノ酸配列を基にクローニングした AgaX をコードする遺伝子は 2394 bp から成り、798 個のアミノ酸残基をコードしていた。また、5’ 末端側にシグナルペプチドと想定される 31 個のアミノ酸残基をコードする領域が存在した。そこで、シグナル配列を除去した成熟型 AgaX をコードする領域を *Escherichia coli* BL21 (DE3) を宿主として高発現させて、組換え AgaX を生産することに成功した。組換え AgaX は native AgaX と同様の性質を示し、アガロース、NA4、NA6 を NA2 にまで完全分解した。組換え AgaX について、1 g/L のアガロースを含む溶液で加水分解試験を行い、反応温度 40°C、反応 pH 7.5 のときにそれぞれ NA2 生産量が最大となったことから、40°C、pH 7.5 を最適反応条件と決定した。最適反応条件下で AgaX を数時間反応させた場合、生成物は NA2 のみであった。以上より、NA2 生産に AgaX が利用可能であることを明らかにした。

[1] **Watanabe, T., *et al.*:** J. Molecul. Catal. Enzyme, in press (2017).
[2] **Kobayashi, R., *et al.*:** Biosci. Biotech. Biochem., **61**, 162-163 (1997).

Agarase, *Cellvibrio* sp., Neoagarobiose

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：3A26a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A26 会場

Paenibacillus 属細菌由来アルギン酸リアーゼの機能解析
Functional analysis of alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7
○伊藤 貴文、中川 えみ、要田 萌、木元 久、日ビ 隆雄（福井県大・生物資源）
○Takafumi ITOH, Emi NAKAGAWA, Moe YODA, Hisashi KIMOTO, Takao HIBI (Fukui Pref. Univ.)

【目的】土壌細菌 *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 (*P.* str. FPU-7) は、複数種のキチン分解酵素を菌体外に分泌し、キチンを強力に分解する[1, 2]。*P.* str. FPU-7 のドラフトゲノムを解析したところ、2 つのキチン分解酵素と並ぶ機能未知のタンパク質を見出した。本研究では、*P.* str. FPU-7 が潜在的に持つ多糖分解システムを明らかにすることで、新規な糖質関連酵素・タンパク質の情報を得ることを目指し、この機能未知タンパク質の機能の同定を行った。
【方法】目的遺伝子をプラスミド pET21b に挿入し、C 末端に His タグが付加されるように発現ベクターを作製した。このベクターで大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した。菌体を培養後、菌体内から、各種クロマトグラフィーにて目的タンパク質を精製した。精製タンパク質の円偏光二色性（CD）スペクトルから二次構造の含量を求めた。次に、ジニトロサリチル酸を利用した還元末端の測定から、様々な多糖に対する分解活性を調べた。アルギン酸リアーゼ活性は 235 nm の吸光度を指標に求めた。アルギン酸分解物の経時変化は、吸光度、粘度計、薄層クロマトグラフィー（TLC）を利用して追跡した。アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸から構成されるヘテロ多糖である。マンヌロン酸が主に含まれる領域（PM)、グルロン酸が主に含まれる領域（PG)、マンヌロン酸とグルロン酸が交互に並ぶ領域（MG)、3 種の画分も調製し、これらに対する活性も吸光度および TLC にて調べた。
【結果】CD スペクトルの結果は､本タンパク質が主に β-ストランドから構成されることを示唆した。また、様々な多糖に対する分解活性を検討した結果、本タンパク質はアルギン酸を特異的に分解していることが示された。そして、分解物の構造解析から、このタンパク質をアルギン酸リアーゼと同定した。至適 pH は 7-7.5、pH 2-10 の領域で安定であった。活性は 70℃付近まで増大するが、安定性は 37℃程度であった。分解物の経時変化から反応形式はエンド型であり、PM 領域を良く切断することが示された。

(1) Itoh, T. Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 79, 7482–7490, 2013.
(2) Itoh, T., Hibi, T., Suzuki, F., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Inaka, K., Tanaka, H., Ohta, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H. ***PLoS One***, 11, e0167310, 2016.

alginate lyase, Paenibacillus, alginate

発表責任者：伊藤 貴文（ito-t@fpu.ac.jp）

講演番号：3A26a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A26 会場

2014-16 年度産の山形県つや姫の品質と登熟温度との関係について

About the relationship between ripening temperature and quality of rice inYamagata "Tsuyahime"

○矢嶋 雄貴[1]、辻井 良政[2]、後藤 元[3]、松原 芳樹[2]、木村 圭一[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]山形農総研セ)

○Yuki Yajima[1], Yoshimasa Tsujii[2], Hajime Goto[3], Yoshiki Matsubara[2], Keiichi Kimura[2], Katsumi Takano[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric, [2]Dept.Appl.biol. Chem.,Fac. Biosci. Tokyo univ. Agric, [3]Yamagata Integrated Agr. Res. Cent)

【目的】

米飯食味は、品種 産地、気候や貯蔵条件、炊飯方法などによって影響を受けることが知られている。近年、温暖化や気候の変動より米の品質を安定して生産することが難しい状況が発生している。2010 年には、イネの高温登熟障害が発生し、新潟県産米では 1 等米比率が 20.9%になるなど、乳白米や胴割米など外観品質の低下が大きな問題になった。本研究において、2014～2016 年に山形県で生産された「つや姫」の食味に関わる米胚乳酵素活性量と官能評価および登熟温度の関係について解析を行い、若干の知見を得ることができたので報告を行う。

【方法】

試料は 2014 年から 2016 年の山形県内の一般圃場で生産された「つや姫」53 点とした。各試料の精米 0.5g より酵素液を調製し、α-amylase、β-amylase、α-glucosidase、β-glucanase、α-galactosidase、β-galactosidase、α-mannosidase および β-xylanase について、それぞれ *p*-ニトロフェノール誘導体合成基質を用いて活性量を測定し、得られた各活性量を変数として主成分分析を行った。また、食味官能試験は、山形県農業総合研究センターで作付けされた「はえぬき」を基準として+3～−3 で、専門家パネル 30 名で評価をした。アミロース含量、タンパク質含量は、近赤外光分析計（Tacator 社 Infratec1255）にて測定した。

【結果】

アメダス山形市における 3 年間の 8 月の平均気温（登熟温度）は、2016 年が 25.7℃と最も高く、ついで 2014 年が 25.0℃、2015 年が 24.3℃であった。高温登熟で問題となった 2010 年の 27.7℃に比べ、2℃ほど低く、各年で作況指数は 103 を超え、品質への影響は少なかった。食味官能評価への登熟温度の影響は確認できなかったが、地域差異が確認された。

米飯食味と理化学的特性の間に明確な関係性は得られなかった。しかし、登熟温度との間に、アミロース含量とは−0.454 および α-アミラーゼ活性量とは−0.596 と負の相関、タンパク質含量とは 0.611 と正の相関が得られた。このことから、食味官能評価の影響がない範囲で理化学的特性が変化していたと考えられた。

Endsperm Enzyme activity, Protein content, Amylose content

講演番号：3A26a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A26 会場

Pseudomonas 属細菌の *trans*-アコニット酸資化性に必須なアコニット酸イソメラーゼ
Aconitate Isomerases of *Pseudomonas* Essential for *trans*-Aconitic Acid Assimilation
○滝口 有沙、平磯 一輝、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Arisa TAKIGUCHI, Kazuki HIRAISO, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sch. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

アコニット酸イソメラーゼ（EC 5.3.3.7；以下 AI）は、植物や *Pseudomonas* 属細菌等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸の可逆的な異性化反応を触媒する酵素である。しかし、自然界における AI の分布や役割については不明な点が多い。演者らの研究室では、*trans*-アコニット酸を資化し AI 活性を示す *Pseudomonas* sp. WU-0701 を土壌より単離し、AI を精製し酵素的諸性質を明らかにした[1]。また、AI 遺伝子を世界で初めて同定し[1]、AI 遺伝子を高発現させた大腸菌細胞を生体触媒として利用しクエン酸から *trans*-アコニット酸を生産することに成功している[2]。本発表では、AI 活性を示す *Pseudomonas* 属細菌について *trans*-アコニット酸やクエン酸を炭素源として培養経過を比較検討し、増殖と AI 活性の関連性および AI の誘導条件について考察した。

【方法および結果】

Pseudomonas sp. WU-0701 の AI 遺伝子をもとにデータベースに登録されている遺伝子との相同性を検索すると、酵素をコードするタンパクとは 20%未満の相同性しか認められなかった。しかし、ABC 輸送体基質結合タンパクとアノテーションされている一部の遺伝子と高い相同性が認められ、とくに *Pseudomonas oryzihabitans* NBRC 102199 由来のタンパク (WP_027599585.1) をコードする遺伝子とは 90%の相同性が見出された[1]。当該遺伝子について大腸菌を宿主としてクローニングし性質を調べたところ、AI 活性を示すことを発見した。そこで、*P. oryzihabitans* NBRC 102199 について *trans*-アコニット酸の資化性を調べたところ、*trans*-アコニット酸を唯一の炭素源とする培地で生育可能で、*Pseudomonas* sp. WU-0701 と同程度の旺盛な菌体増殖 (OD 値) が認められた。すなわち、遺伝子の相同性をもとにした探索によって新規な AI と *trans*-アコニット酸資化性細菌を取得したことになる。一方、WU-0701 株と NBRC 102199 株の AI 遺伝子上流には調節に関与する領域が存在するはずであるが、DNA の配列情報からは明瞭なプロモーター配列を見出すことはできなかった。そこで、炭素源による AI 活性の変化を調べ、*trans*-アコニット酸による酵素の誘導があるかどうかを検討し、AI の誘導条件について考察した。

[1] K. Yuhara, et al., FEBS J., **282**, 4257-4267 (2015). (Editor's choice.)
[2] K. Koboyashi, et al., Chem. Select, **6**, 1467-1471 (2016).

Aconitate Isomerase, *trans*-Aconitic Acid, *Pseudomonas*

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：3A26a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A26 会場

セレン蓄積植物における NAD 依存 GAPDH のセレンによる活性化機構

The activation mechanism of NAD-GAPDH by low levels of selenium in selenium accumulator.

○高貝 俊生、武田 徹（近畿大農）
○Toshiki TAKAGAI, Toru TAKEDA (Kindai Univ.)

【目的】ヒトや動物にとって必須微量元素であるセレン（Se）の必要性は、Se をセレノシステイン（SeCys）として有するグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシンレダクターゼなどのセレンタンパク質の抗酸化能およびレドックス調節能などの生理機能によって説明される。一方、植物において、セレンタンパク質は存在しないことから、Se の必須性は明確に証明されていない。しかし、環境中の Se 循環を考えると、植物においても Se が有効に機能することは考えられる。また、植物は、Se をセレン酸塩として根の硫酸トランスポーターから取り込み、その後、硫黄同化経路により SeCys にまで代謝することが明らかになっている。以上のことを踏まえ、我々はシロイヌナズナにおける Se の生理的意義の解明を試みてきた。その結果、低濃度の Se 存在下でシロイヌナズナを栽培すると、解糖系酵素の一つであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（NAD-GAPDH）の活性の増加と、それに伴う生育促進が確認された。さらに、NAD-GAPDH の活性の増加は、還元型グルタチオン（GSH）を介した NAD-GAPDH のセレン化によることが明らかになった。そこで本研究では、Se 蓄積種であるブロッコリーにおける、NAD-GAPDH への翻訳後 Se 取り込みと活性化機構の解明を試みた。
【方法・結果】ブロッコリーは、1~100 μM セレン酸ナトリウムを含む 50 %ムラシゲスクーグ培地用混合塩類存在下で、明期 16 時間、暗期 8 時間、25°C の条件にて 10 日間栽培した。まず、ブロッコリーの生育に及ぼす Se の影響を乾燥重量で評価したところ、コントロールと比べすべての Se 添加群の乾燥重量は、約 1.3 倍増加していた。この結果から、Se の添加はブロッコリーの生育を促進することが推測された。次に、NAD-GAPDH 活性に及ぼす Se の影響を調べたところ、葉部の NAD-GAPDH 活性は、コントロールから 20 μM Se 添加群まで、段階的な活性の増加が確認された。最も活性が増加していた 20 μM Se 添加群では、その活性はコントロールに比べて 1.47±0.04 倍増加しており、100 μM Se 添加群では、活性の増加は 1.15±0.07 倍であった。茎部の NAD-GAPDH 活性は葉部に比べて低かったが、葉部の酵素と同様の Se による増加傾向が確認された。これらの結果より、ブロッコリーにおいて低濃度 Se 添加は解糖系酵素 NAD-GAPDH を活性化し、それに伴い、生育が促進することが示唆された。また、NAD-GAPDH の活性は、Se の添加量が 20 μM の場合で最大となり、それ以上の Se 濃度では活性の増加が抑制されることが確認された。現在、GSH を介した NAD-GAPDH タンパク質への Se 取り込み機構と、それに伴う活性化機構について、精製酵素を用いて検討を行っている。

selenium, GAPDH, *Brassica oleracea*

発表責任者：武田 徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A26a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A26 会場

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの構造解析
Structural analysis of tetrathionate hydrolase from the iron- and sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacills ferrooxidans*.

○金尾 忠芳[1]、長谷 成記[1]、小坂 恵[2]、上村 一雄[1]、玉田 太郎[3] ([1]岡山大院環境生命、[2]岡山大自然研支セ、[3]量子研)
○Tadayoshi Kanao[1], Naruki Hase[1], Megumi Kosaka[2], Kazuo Kamimura[1], Taro Tamada[3] ([1]Grad. School Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Adv. Sci. Res. Center, Okayama Univ., [3]QST)

【背景と目的】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二酸化炭素を唯一の炭素源とし、生育のためのエネルギーを二価鉄または還元型無機硫黄化合物を酸化することにより獲得する、好酸性の化学合成独立栄養細菌である。我々は本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）を分離精製し、これをコードする遺伝子（*Af-tth*）を同定した。

4THase は、テトラチオン酸（$S_4O_6^{2-}$）を単体硫黄（S^0）とチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）、そして硫酸（SO_4^{2-}）へと加水分解する反応を触媒する。本酵素は、*Acidithiobacillus* 属と一部の好酸性微生物からのみ活性が報告されている非常にユニークな酵素である。これまで報告されている他の多くの硫黄代謝酵素では Cys 残基のチオール基が基質の硫黄原子とジスルフィド結合を形成することが知られており、これらの活性中心には Cys 残基が保存されている。しかしながら、本酵素に唯一存在する Cys 残基を Ala 置換した変異酵素の研究から Cys 残基は触媒反応に関与しないことが解明された。このことから本酵素は Cys 残基が関与しない新規な反応機構を有することが期待された。本研究では組み換え *Af*-Tth の結晶を用いた X-線結晶構造解析を行い、基質と相互作用するアミノ酸残基を特定し反応機構を推定することを目的とした。

【結果と考察】我々は既に *Af*-Tth の結晶化に成功し、この結晶について X-線を照射し結晶構造解析を推進している。*Af*-Tth 結晶を基質のテトラチオン酸溶液に浸すことで酵素–基質複合体を形成させ、これの X-線回折像を収集して結晶構造解析を行った結果、基質のテトラチオン酸と考えられる電子雲を本酵素の構造内に観察することができた。この基質から 3.2 Å の距離に存在する Asp 残基に注目し、これが関わる新規な加水分解反応を推定し、部位特異的変異によりこの Asp 残基を Ala 置換した変異酵素を作成することによって確認した。今回、さらなる解析を進めた結果、この基質の近傍に本酵素に極めて特徴的な３つの Met 残基（便宜上 Met-1, Met-2, Met-3 とする）で形成された三脚状の構造と、生成物と期待される硫黄原子の重合物が確認できた。この三脚状の構造と本酵素活性との関係を調べるために、これら３つの Met 残基に対しそれぞれ部位特異的変異導入を行った。それぞれの Met 残基を Ala 残基に置換した変異酵素のうち、Met-1-Ala, Met-2-Ala については野生型 *Af*-Tth と同程度の比活性を示したが、Met-3-Ala 変異酵素に関しては活性が完全に消失した。この変異酵素において野生型酵素と同様に結晶化・X-線結晶構造解析を行ったが変異による構造変化は見られず、Met-3 は活性に関与する重要な残基であることが推定された。

tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

発表責任者：金尾忠芳（tkanao@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3A26a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A26 会場

含塩素有機リン難燃剤分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 株の PhoK アルカリホスファターゼの機能解析

Characterization of PhoK type alkaline phosphatase of the chlorinated organophosphorus flame retardant-degrading bacterium *Sphingobium* sp. strain TCM1

○高橋 祥司、諸岡 由佳、佐伯 栞里、片沼 拓士、阿部 勝正、解良 芳夫 (長岡技科大・生物)
○Shouji TAKAHASHI, Yuka MOROOKA, Shiori SAEKI, Hiroshi KATANUMA, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】含塩素有機リン酸トリエステルである tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)は潤滑剤や難燃可塑剤として幅広く利用されているが，物理化学的に安定であり微生物分解を受け難いため，様々な環境中で検出されている．また近年，発ガン性や神経毒性が報告されたことから，ヒトを含む生態系への悪影響が懸念されている．本研究室では，TCEP 分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 株を単離し，一連の分解代謝に関わる酵素群（ホスホトリエステラーゼ，ホスホジエステラーゼ，アルカリフォスファターゼ(APase)を同定した．APase には 4 つの遺伝子（*SbphoA*, *SbphoK*, *SbphoD1*, *SbphoD2*）が見いだされ，SbphoA と SbphoK が TCEP 分解代謝に関与していることが示された．そのうち，SbPhoK が主要な役割を担っていることが明らかとなった．そこで研究では，*E. coli* で発現させた SbPhoK の酵素学的諸特性を解析した．

【方法・結果】*SbphoK* 遺伝子を pET25b ベクターに導入し，*E. coli* において His タグ融合タンパク質として発現させ精製した．精製した SbPhoK の N 末端アミノ酸配列を解析したところ，シグナルペプチドが除去された成熟体であることが分かった．ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析から，SbPhoK は二量体もしくは三量体であることが示唆された．SbPhoK の 37℃における *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP)に対する活性は 502 U/mg であった．至適温度は 50℃であり，T_{50} 値（活性の半分が失活する温度）は 48℃であった．至適 pH は 10.0 であり，pH 6.0～10.5 の領域で安定であった．SbPhoK の活性は，1 mM Fe^{3+}により増加したが，Zn^{2+}と *o*-phenanthroline により著しく阻害された．また，1 mM vanadate, DTT と 1% SDS により著しく阻害された．SbPhoK は，ATP などのヌクレオチドを含む種々の有機リン化合物に対して，*p*NPP に対する活性の 30%以上の活性を示したが，ホスホジエステラーゼの基質となる bis(*p*-nitrophenyl) phosphate に対する活性は著しく低かった．また，*p*NPP を用いた反応速度論解析において基質阻害が観察された．

alkaline phosphatase, enzymatic chracteristics, *Sphingobium* sp. strain TCM1

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3A26a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A26 会場

Sphingobium fuliginis pPDL2 脱落株による有機リン系化合物分解酵素の産生と分泌
Production and secretion of organophosphorus hydrolase from pPDL2-cured *Sphingobium fuliginis*

○川原 一芳[1]、岩田 なつみ[1]、市村 紗季[1]、有路 沙織[1]、大森 毅[2]、瀬戸 康雄[2]、石川 暁志[3]([1]関東学院大理工・生命、[2]科学警察研究所、[3]いわき明星大薬)
○ Kazuyoshi KAWAHARA[1], Natsumi IWATA[1], Saki ICHIMURA[1], Saori ARIJI[1], Takeshi OHMORI[2], Yasuo SETO[2], Satoshi ISHIKAWA[3] ([1]Kanto Gakuin Univ., [2]National Research Institute of Police Science, [3]Iwaki Meisei Univ.)

【目的】*Sphingobium fuliginis* ATCC 27551 株はパラオキソン等の農薬、およびサリン等の神経剤を含む有機リン系化合物を分解することができる Organophosphorus hydrolase （OPH）を産生する。OPH は有機リン系神経剤を効率よく分解できることから、世界的に化学テロ等の汚染除去手段として研究されている。我々も大腸菌にクローニングした OPH の活性中心に変異を導入し、VX 分解活性を高めた変異酵素の作製を行ってきた[1)]。しかし、OPH を実際の汚染除去に使用するためには、簡便な大量調製法を確立する必要があると考えられる。このため、これまでの研究で、本来の産生菌である ATCC 27551 株に変異型 OPH 遺伝子を戻し、大腸菌よりも多く OPH を産生できる系を確立した[1)]。さらに ATCC 27551 株の野生型 OPH 遺伝子をコードするプラスミド pPDL2 を脱落させることにより、変異型 OPH のみを産生させるための宿主株を作製した[2)]。そこで、本研究ではこの脱落株を用いて、変異型 OPH の産生量と分泌量について検討した。
【実験方法】酵素活性の測定にはパラオキソンを基質として用い、分解により生じるパラニトロフェノールの呈色を 410 nm の吸光度で測定した。変異 OPH 遺伝子をコードするベクタープラスミドには pTV118N あるいは pUC119 を用い、N 末端に本来の分泌シグナルペプチド配列を持ち、C 末端には精製のためのヒスチジンタグを付加した OPH 遺伝子と、*Sphingobium* 中で複製を可能にするための複製開始点を組み込んで使用した。菌体外に分泌された OPH の濃縮には、限外ろ過法と硫安沈殿法を用いた。
【結果】pTV118N によるベクターのプロモーターを利用した発現系と pUC119 による OPH 自身のプロモーターによる発現系では産生量に大きな差は見られなかった。一方、宿主として pPDL2 を保有する野生株を使用した場合と比べると、脱落株を使用した場合には OPH 産生量は 100 分の 1 程度であった。この結果から、pPDL2 が OPH の産生量の調節にも関わっている可能性が示唆された。菌体の破砕により得られた OPH と培養液中に分泌された OPH の活性を比較したところ、pPDL2 保有株では全産生量の約 1 割が菌体外に分泌されたのに対して、脱落株では産生量は少ないものの、菌体内に留まる量と分泌される量がほぼ同じであることがわかった。

1) Nakayama, K., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 1024-1026, (2016)
2) Ishikawa, S., et al., 日本農芸化学会 2017 年度大会要旨・講演番号 4J33a08

Organophosphorus hydrolase, nerve agent, *Sphingobium fuliginis*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A26a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A26 会場

GH 20 β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼに対する *N,N,N*-trimethyl-D-glucosaminyl (TMG)-chitotriomycin の阻害様式
N,N,N-trimethyl-D-glucosaminyl (TMG) chitotriomycin: An inhibitor toward GH20 β-*N*-acetylglucosaminidases
○森本 雄介[1]、磯田 悠太[2]、Suginta Wipa[3]、深溝 慶[3]、伊藤 敏幸[2]、野上 敏材[2]、大沼 貴之[1] ([1]近大院・農、[2]鳥取大院・工、[3]Suranaree Univ)
○Yusuke Morimoto[1], Yuta Isoda[2], Wipa Suginta[3], Tamo Fukamizo[3], Toshiyuki Itoh[2], Toshiki Nokami[2], Takayuki Ohnuma[1] ([1]Kindai Univ., [2]Tottori Univ., [3]Suranaree Univ.)

【目的】
TMG-キトトリオマイシンは、ファミリーGH 20 に分類される β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcases) (EC 3.2.1.52)の酵素活性を阻害する阻害剤として、*Streptomyces anulatus* NBRC13369 の培養濾液から単離された。TMG-キトトリオマイシンはキチンオリゴ糖 3 糖の非還元末端に TMG 基が β-1,4 結合した構造を有し、GlcNAcases の基質結合部位に競合的に結合することによって阻害活性を示す。本阻害剤は昆虫および細菌由来の GlcNAcase に対して阻害活性を示すが、植物や動物由来の GlcNAcase を阻害しない選択的阻害剤であることも報告されている。本研究は、電解自動合成によって作製された TMG-キトトリオマイシンを用いて、*Vibrio harveyi* 由来 GlcNAcase[1)]に対する阻害様式の詳細を解明することを目的としている。

【方法・結果】
TMG-キトトリオマイシン存在下と非存在下における GlcNAcase の反応速度論的解析から、TMG-キトトリオマイシンの細菌由来 GlcNAcase に対する阻害活性は μM レベルであることがわかった。また、等温滴定型カロリメトリー(ITC ; Isothermal Titration Calorimetry)を用いて TMG-キトトリオマイシンと同酵素の相互作用解析を行った結果、結合のギブス自由エネルギー変化Δ*G* は−8.1 kcal/mol であり、エンタルピー変化（Δ*H* = −3.1 kcal/mol）とエントロピー変化（−*T*Δ*S* = −5.0 kcal/mol）が共に結合に寄与していることがわかった。結合におけるエンタルピー変化(Δ*H*)の温度依存性を測定し、熱容量変化の決定(ΔC_p = −202.9 cal/K mol)とエントロピー項のパラメタリゼーションを行った。その結果、水和エントロピー変化の値（−*T*ΔS_{solv} = −14.5 kcal/mol）から、相互作用面における脱水和が両者の結合に重要であることが示唆された。*Vibrio harveyi* 由来 GlcNAcase と TMG-キトトリオマイシンの複合体のモデル構造を構築し、両者の結合部位を調べたところ、-1 サブサイトと+1 サブサイトにおけるトリプトファン残基とのスタッキング相互作用の形成が示唆された。また、他の生物由来 GlcNAcase とのアミノ酸配列のアライメントの結果、+1 サブサイトのトリプトファン残基は昆虫および細菌由来の GlcNAcase にのみ保存されており、この保存性が阻害選択性の一要因であることが示唆された。現在、TMG-キトトリオマイシンの結合における 2 つのトリプトファン残基の寄与について解析を進めている。

1) Suginta *et al*., *BMC Biochem*. 2010. doi: 10.1186/1471-2091-11-40.

GH20 ß-N-acetylglucosaminidase, Inhibitor, TMG-chitotriomycin

講演番号：3A27a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A27 会場

ブラシノステロイド情報伝達におけるマスター転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤

Structural basis for DNA binding specificity by the brassinosteroid-dependent master transcription factor

○野崎 翔平[1]、宮川 拓也[1]、浅見 忠男[1]、中野 雄司[2]、田之倉 優[1]([1]東大院・農生科、[2]理研 CSRS)
○ Shohei NOSAKI[1], Takuya MIYAKAWA[1], Tadao ASAMI[1], Takeshi NAKANO[2], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]RIKEN CSRS)

ブラシノステロイド（*brassinosteroid*; BR）は植物の生長・発達および環境シグナル応答において重要な役割を担う植物ホルモンである。BR 存在下ではマスター転写因子 Brz-insensitive-long hypocotyl 1 (BIL1)/Brz-resistant 1 (BZR1) およびそのホモログが活性化し、シロイヌナズナにおいては BIL1/BZR1 が数千にのぼる遺伝子を制御することが知られている。BIL1/BZR1 は植物特異的な転写因子ファミリーに属し、basic helix-loop-helix（bHLH）ファミリー様の DNA 結合ドメインを有する。BIL1/BZR1 は、MYC2 や PIF4 などの bHLH ファミリーと同様に DNA 上の G-box 配列（CACGTG）を認識する転写因子であるが、不完全な G-box 配列である BZR モチーフ（CGTG）にも十分に結合することができ、G-box 結合型 bHLH ファミリーとは異なる塩基配列認識特異性をもつ。しかし、この 2 つのファミリー間において塩基配列認識が異なる理由はこれまでわかっていなかった。そこで本研究では、BIL1/BZR1 ファミリーの塩基認識特異性を構造生物学的手法で明らかにすることにした。

シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと G-box 配列を含む DNA との複合体の結晶を作製し、X 線結晶構造解析により立体構造を決定した。BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインは bHLH ファミリーと同様に C 末端側の領域で二量体を形成し、N 末端側の塩基性領域で DNA を認識していた。しかし、BIL1/BZR1 の C 末端領域は既知の bHLH ファミリーとは異なる構造をとることで、non-canonical な二量体構造が形成されていることがわかった。興味深いことに、この二量体形成様式の違いに伴い、DNA に対する BIL1/BZR1 の塩基性領域を含むαヘリックスの配向が既知の bHLH ファミリーの配向と比べて大きく異なっていた。また、BIL1/BZR1 の塩基認識に係わる残基は G-box 結合型 bHLH と共通していたが、塩基性ヘリックスの配向変化と BIL1/BZR1-DNA 内で形成される特徴的な塩橋・水素結合ネットワークによって、塩基認識に係わる残基の配向に違いが生じていた。こうした二量体形成領域の構造の違いとそれに連動したαヘリックス及び塩基認識に係わる残基の配向の違いが、BIL1/BZR1 ファミリーと bHLH ファミリーの潜在的な塩基配列認識特異性を異なったものにし、BR 応答性遺伝子の転写調節を可能にしていると考えられる。

brassinosteroid, transcription factor, X-ray crystallography

講演番号：3A27a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A27 会場

カロテノイド異性化酵素 D27 変異体の酵素活性
Enzymatic activity of carotenoid isomerase D27 mutant
○佐藤 美咲、宇都宮 玲太、牧 遼、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介（東農大・生命科・バイオ）
○Misaki SATO, Ryota UTSUNOMIYA, Ryo MAKI, Sinsaku ITO, Yasuyuki SASAKI, Shunsuke YAJIMA (Tkyo University of Agriculture)

【背景・目的】
ストリゴラクトンは近年同定された植物ホルモンであり、植物体の分枝抑制等に関与している。また、共生関係にあるアーバスキュラー菌根菌の菌糸伸長やストライガ等の根寄生植物の発芽誘引にも関与しており、農作物の生育に大きく影響を与える化合物である。

ストリゴラクトン合成経路では、D27、carotenoid cleavage dioxygenase 7(CCD7)、CCD8、P450(MAX1)等の複数の合成酵素が関与している。イネ(*Oryza sativa*)由来 D27(OsD27)はこの合成経路において all-trans-β-carotene から 9-cis-β-carotene への異性化を触媒する酵素で、N 末端から 40 残基までのシグナル配列と 173 から 252 残基までの機能未知ドメインを 1 つ持つことが明らかになっており、その活性には鉄硫黄クラスターが関与している事が示唆されているが、その反応機構の詳細は不明である。本研究は、ストリゴラクトンの合成経路における D27 の反応機構を解明することを目的とし、活性の維持に必要なアミノ酸残基を特定するために変異体 D27 を用いて活性測定を行った。2 鉄 2 硫黄/4 鉄 4 硫黄クラスターは一般的にタンパク質のシステインに由来する 4 つの S 原子が配位することで形成されるため、D27 ホモログ間で保存性の高い Cys 残基に変異を加えて実験を行った。

【方法・結果】
大腸菌内でβ-carotene 産生を可能にするベクターpAC-BETA と *OsD27* 遺伝子を組み込んだ可溶化タグ(GST)融合タンパク発現用ベクターを大腸菌に導入し、大腸菌から抽出したβ-carotene 含有画分を HPLC にて分析を行い all-trans-β-carotene と 9-cis-β-carotene の生成量を確認することで、大腸菌内での酵素活性を測定した。

D27 ホモログ間でアライメント比較を行ったところ、保存性の高い Cys 残基が 8 箇所存在していた。D27 の活性に重要な Cys 残基に関する考察を得るため、アラニンスキャニングを行った結果、4 つの変異体においてネガティブコントロールと同程度までの活性の低下が確認された。変異を加えることによって活性が低下したこれらの Cys 残基が、鉄硫黄クラスターの形成に関与していると考えられた。

Stigolactone, enzyme activity, Fe-Scluster

講演番号：3A27a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A27 会場

システイン合成酵素活性を負に制御するシステイン合成酵素様タンパク質
A spinach cysteine synthase-like protein,CSaseLP,suppresses the cysteine synthase activity of a cytosolic isozyme
○石川 知世子[1]、児玉 浩明[2] ([1]千葉大・園芸、[2]千葉大院・園芸)
○Chiyoko ISHIKAWA[1], Hiroaki KODAMA[2] ([1]Fac.Horticul., Chiba Univ., [2]Grad.Sch.Horticul., Chiba Univ.)

（背景）
植物は、根から硫酸イオンを吸収し、様々な含硫化合物を合成している。その主要経路である硫化物イオンのシステインへの取り込みにおいて、セリンアセチルトランスフェラーゼ（SAT）の 6 量体と２つのシステイン合成酵素（CSase）２量体が重要な役を担っている。CSase は、O-アセチルセリンと硫化物イオンからのシステイン合成反応を触媒する。ホウレンソウでは、サイトゾル、葉緑体、ミトコンドリアにそれぞれ CSaseA, B, C が存在している。
当研究室では、ホウレンソウの CSaseA の cDNA 単離の過程で塩基配列のよく似た cDNA が得られ、CSaseLP と名付けた。この CSaseLP のシステイン合成活性を検討するために CSaseA と CSaseLP をそれぞれ過剰発現させたタバコを作成したところ、CSaseA 過剰発現株では WT よりも高いシステイン合成活性が得られたが、CSaseLP 過剰発現株では WT よりもその活性は著しく低くなった。この結果から、タバコ内在性 CSase と CSaseLP が相互作用し、活性が低下していることが示唆された。本研究では、CSaseLP による CSase 酵素活性調節について調べた。

（結果と考察）
CSaseLP は、タバコ CSase 活性を抑制するが、ホウレンソウ CSaseA の活性に対する影響は調べられていない。そこで、CSaseLP と CSaseA 形質転換株を交配し得られた交配株でのシステイン合成活性を調べたところ CSaseLP 形質転換株よりも活性が高く、WT より活性が低いという結果が得られた。このことからホウレンソウにおいて CSaseLP は、CSaseA の酵素活性を抑制すると示唆された。CSaseLP は CSaseA のパラログ遺伝子であるが、システイン合成の負の制御因子として働いている可能性がある。また、CSaseA と CSaseLP のアミノ酸配列において約 70%の相同性があり、この配列を比較するとクレフトにあたる 120-130 番目アミノ酸配列が大きく異なっている。CSaseLP に CSase 酵素活性がないのは、この配列の違いによるものと考えられた。そこで、その部分のみを CSaseA の配列にした改変 CSaseLP を作製し、その CSase 活性について検討したので報告する。

cysteine biosyuthesis, OAS-TL, isozyme

講演番号：3A27a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズ PDI ファミリータンパク質と Ero1 の量的バランスによるタンパク質の酸化的フォールディングの制御

Regulation of oxidative protein folding by quantitative balance between soybean PDI family proteins and Ero1

○奥田 綾、松崎 元紀、河野 慧一、土 雄一朗、廣瀬 明歩、増田 太郎、裏出 令子 (京大院農・農学)
○Aya OKUDA, Motonori MATSUSAKI, Keiichi KONO, Yuichiro TSUCHI, Akiho HIROSE, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【目的】真核細胞の小胞体では、新生タンパク質の多くがジスルフィド結合形成を伴ったフォールディング(酸化的フォールディング)を受ける。真核細胞の主な酸化的フォールディング経路として Ero1/Protein Disulfide Isomerase(PDI)経路が知られている。ダイズの Ero1(GmERO1)は、5 種類の PDI ファミリータンパク質を酸化・活性化するとともに、これらの PDI ファミリーによって活性制御を受けていることを明らかにしてきた。本研究では生体内における GmERO1 と複数の PDI ファミリータンパク質による酸化的フォールディングの作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】各ダイズ PDI ファミリーの抗血清を用いた共免疫沈降実験により、GmPDIL-1 及び GmPDIS-1 が生体内で会合していることを既に明らかにしているが、これらと野生型及び活性型に固定された変異体 GmERO1(C121/146A)を用いて酸化的リフォールディング活性を検討した。野生型 GmERO1 存在下で GmPDIS-1 は GmPDIL-1 の RNaseA のリフォールディングを促進するが、 C121/146A 存在下ではリフォールディングがほとんど進行しないことが明らかとなった。これは、C121/146A によって過剰に酸化・活性化された GmPDIS-1 が dead end となるジスルフィド結合を基質に導入するためであることが非還元 SDS-PAGE により示された。これらのことから、酸化的フォールディングには GmERO1 による PDI ファミリーの酸化・活性化と PDI ファミリーによる基質へのジスルフィド結合形成が適切に制御されることが重要であり、生体内ではこれが PDI ファミリー及び GmERO1 の量的バランスにより保たれているのではないかと考えられた。定量ウエスタンブロット分析によりダイズ子葉における GmPDIL-1、GmPDIS-1 及び GmERO1 の存在量を明らかにし、これらの生体内における存在比率でリフォールディング活性を測定したところ、C121/146A 存在下でも GmPDIS-1 を共存させると劇的に GmPDIL-1 のリフォールディング反応を促進することが明らかとなった。以上のことから、生体内では複数の PDI ファミリー及び GmERO1 が小胞体内での酸化的フォールディングに適した比率で存在しており、それらの酸化還元状態が双方向の調節機構で適正に保たれることで効率的なタンパク質フォールディングが行われていると考えられる。

Protein Disulfide Isomerase, Ero1, Oxidative folding

講演番号：3A27a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A27 会場

ダイズ ERO1 における新規活性調節機構の検討
Analysis of regulation of soybean ERO1
○松崎 元紀、奥田 綾、成尾 由理香、河野 慧一、増田 太郎、裏出 令子 (京大院農)
○Motonori MATSUSAKI, Aya OKUDA, Yurika NARUO, Keiichi KONO, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【背景と目的】真核細胞の小胞体では、新生ポリペプチド鎖の多くが分子内ジスルフィド結合形成をともなってフォールディングされる。この酸化的フォールディングの主要経路は Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (Ero1) - Protein Disulfide Isomerase (PDI)経路であり、新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成反応を触媒することで酸化型から還元型となった PDI ファミリーの活性中心は、Ero1 によって酸化されることで再びジスルフィド結合形成触媒活性を回復する。この経路において、フォールディングを妨げる PDI ファミリーの過剰な酸化や酸化に伴う H_2O_2 の過剰な生成を防ぐため、Ero1 の活性は厳密に制御されなければならない。これまでに我々は、ダイズ PDIL7(GmPDIL7)を含む少なくとも 5 種のダイズ PDI ファミリーがダイズ Ero1(GmERO1)の分子内ジスルフィド結合に作用して活性調節を行いうることを明らかにした。本研究では、これまで発見した GmERO1 の活性調節機構のさらなる解析を進めると共に、新たな活性制御機構の存在を検討した。
【方法】PDI ファミリーGmPDIL7 、野生型および活性中心あるいは制御システインと推定されたシステイン残基をアラニンに置換した変異型 GmERO1 を大腸菌発現系により大量発現し、純化した。GmERO1 の GmPDIL7 酸化活性は、酸素消費速度あるいはグルタチオンレダクターゼをカップリングさせた NADPH 消費速度により測定した。GmERO1 の活性化はシステイン修飾剤を用いた非還元 SDS-PAGE により検出した。
【結果と考察】GmPDIL7 の活性中心を酸化する過程で、GmERO1 は GmPDIL7 依存的に活性化され、時間経過に応じて非還元 SDS-PAGE 上で不活性型である ox2 型から移動度が遅い ox1 型となった。哺乳動物 Ero1 との配列比較により活性制御に関わると予想された 121 番目および 146 番目のシステイン残基をアラニンに変異させ、活性型を模した C121/146A は非還元 SDS-PAGE 上で活性型(ox1 型)に近い泳動度を示し、GmPDIL7 酸化速度も約 1.7 倍に上昇した。このとき野生型よりも短時間ではあるが、C121/146A による GmPDIL7 酸化速度が最大になるまでにはタイムラグがあった。これは C121/146A でも何らかの活性化が起きていることを示している。現在、C121/146A およびその他の変異型 GmERO1 の活性化を経時的に非還元 SDS-PAGE 上で解析し、これらの変異型 GmERO1 と野生型 GmERO1 の ox1 型を比較することで未知の活性化機構が存在するかを検討中である。

protein disulfide isomerase, oxidative folding, ERO1

講演番号：3A27a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A27 会場

植物アスコルビン酸生合成の鍵酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼの活性調節機構の検討
Regulation mechanism of enzyme activity for GDP-L-galactose phosphorylase, a key enzyme for ascorbate biosynthesis in plant
○崎山 佳祐、小川 貴央、丸田 隆典、石川 孝博（島根大・生資科・生命工）
○Keisuke SAKIYAMA, Takahisa OGAWA, Takanori MARUTA, Takahiro ISHIKAWA (Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

植物のアスコルビン酸は、D-マンノース(D-Man)/L-ガラクトース(L-Gal)経路を主要経路として生合成され、そのプールサイズは光応答性を示す。GDP-L-Gal ホスホリラーゼは、D-Man/L-Gal 経路構成酵素として無機リン酸依存的に GDP-L-Gal から L-Gal 1-P の生成反応を触媒する。この酵素をコードする *VTC2* 遺伝子は、D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子の中でも特に、光により最も顕著に発現誘導されること、シロイヌナズナの一過的発現誘導系において *VTC2* 遺伝子発現を誘導した場合にのみ葉中アスコルビン酸量が上昇すること、などの事実から、アスコルビン酸生合成調節の中心的役割を担っている。今回、*VTC2* 遺伝子の転写調節における知見に加え、酵素タンパク質レベルによるアスコルビン酸生合成調節の可能性を検討するため、組換え体酵素による GDP-L-Gal ホスホリラーゼ活性の評価を行った。大腸菌にて GST 融合タンパク質として組換え体 GDP-L-Gal ホスホリラーゼを発現させた後、HRV 3C protease により GST タグを切断し、アフィニティーカラムによりほぼ均一な精製標品を調整した。GDP-L-Gal ホスホリラーゼは不安定であり、酵素調整後 24 時間までに約 70%失活した。種々の酸化剤および還元剤の影響について検討した結果、過酸化水素や PCMB により失活した。還元剤として DTT および EDTA を加えた場合に安定性は改善したが、アスコルビン酸に対しては高い感受性を示した。特に酸化型アスコルビン酸(DHA)を添加した場合、コントロールあるいはアスコルビン酸添加の場合と比較しても失活が著しかった。その要因について DHA 結合性および DHA 分解物による影響等を検討した結果、1 mM シュウ酸を添加した場合、約 60%失活することが示され、GDP-L-Gal ホスホリラーゼは DHA 分解物のシュウ酸により活性調節を受けることが示唆された。

Ascorbic acid, enzyme activity, phosphorylase

講演番号：3A27a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A27 会場

ピタヤにおける新規ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼアイソフォーム
A novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in pitaya *Hylocereus undatus*
○堂園 真佑[1]、前田 隆昭[2]、野村 啓一[1] ([1]神戸大学、[2]南九州大学)
○Mayu DOZONO[1], Takaaki MAEDA[2], Keiichi NOMURA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Minami Kyusyu Univ.)

【背景と目的】Phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC)は，Phosphoenolpyruvate に HCO_3^-を付加する反応を触媒する酵素である．代謝物質の生合成や窒素同化などで失われる有機酸を TCA 回路に補充する一方，C_4，CAM 型植物においては初期の炭酸固定も担っており，その多様な役割や複雑な活性制御を満たすためにマルチジーンファミリーを形成している．植物において，PEPC はアミノ酸配列の相違に基づき，植物型 PEPC（PTPC）と細菌型 PEPC（BTPC）に大別できる．PTPC は N-末端領域の Ser 残基がリン酸化されるが，BTPC では特徴的な約 10kDa の挿入領域内の Ser 残基がリン酸化されることで，それぞれ活性制御を受けている．ピタヤ（*Hylocereus undatus*）はサボテン科に属する CAM 植物であり，PEPC が炭素固定において重要な役割を果たすと考えられる．本研究では，ピタヤにおける PEPC の機能解析を目的としているが，PCR-クローニングの結果，既報の PTPC とは性質が異なると考えられる 3 つのアイソフォーム（HuPC1,2,3）を検出したので，系統解析の結果と合わせて報告する．
【方法と結果】ピタヤの光合成器官である葉状枝から mRNA を抽出し，cDNA 塩基配列の解析結果に基づいてアミノ酸配列を推定した．他の植物種の PEPC とアライメントにより比較した結果，HuPC1～3 のアミノ酸配列は特徴的であり，特に HuPC1,2 は，PTPC において高度に保存されている N-末端領域の Ser リン酸化モチーフが存在しないことに加え，22 残基のアミノ酸の欠損が存在した．3 つのアイソフォーム全てで，PTPC のモノユビキチン化に関与する Lys 残基は保存されている一方，BTPC に特徴的な挿入領域やリン酸化残基は認められなかった．系統解析を行った結果，HuPC の 3 つのアイソフォームは全て PTPC に近いものの独立したグループを形成していた．このグループにはサボテン科の植物が存在したが，他の CAM 植物であるパイナップル，アロエとは異なっていた．
【考察】N-末端領域のリン酸化モチーフを持たないことから，HuPC の活性は既報の PTPC とは異なった機構によって制御されていると考えられる．他の部位でのリン酸化が考えられるが，この場合はリン酸化を受ける部位の特定と共に，リン酸化を触媒する PEPC キナーゼが他の植物種とは異なる可能性があり，その機能解析も必要となる．系統解析の結果では，これらの特徴はサボテン科に共通すると考えられ，サボテン科においては他の CAM 植物とは異なった要因で活性制御を行っていることを示唆している．

Phosphoenolpyruvate carboxylase, Crassulacean acid metabolism, *Hylocereus undatus*

発表責任者：野村啓一（knomurak@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A27a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A27 会場

植物 RuBisCO は形状記憶能力の獲得によって環境適応を達成

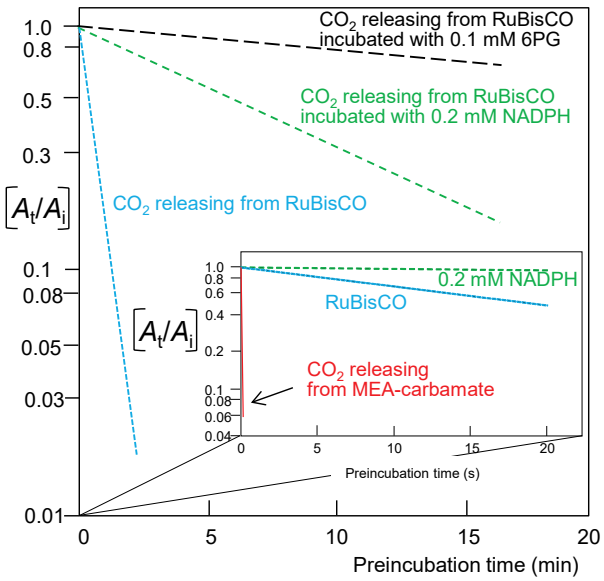
Plant RuBisCO adapted to the present low concentrations of CO2 by acquiring the conformation-memorizing ability

○横田 明穂（植物ハイテック研・奈良先端大）
○Akiho Yokota (Plant Hi-Tech Inst., NAIST)

[目的] 光合成で CO_2 固定反応に関与する RuBisCO は溶存 CO_2 を直接基質にする酵素である。最近我々は、RuBisCO は光合成生物が地球上に出現するかなり以前にメタン生産アーキアで機能していたことを見出した（Kono et al. (2017) *Nat. Commun*. 8:14007）。その当時は溶存 CO_2 濃度は 20 mM を超えていたと考えられ、現存するアーキアによるメタン生産においてもメタノフランへの CO_2 結合は化学反応で進行する（Bartoschek et al. (2000) *EJB*）。RuBisCO と CO_2 の反応は個別に 2 通り行われているが、これらの反応は現在も化学反応で進行している。当時と比べて現在の CO_2 濃度は 1/2000 以下に低下している。RuBisCO が現在の CO_2 濃度で十分に機能するには未解明の機構が存在するに違いないと考え、RuBisCO が現環境中でも CO_2 固定能力を維持している機構を考察した。

[方法] RuBisCO と溶存 CO_2 の反応は、RuBisCO の反応中心形成のための Lys201-NH_3^+のカルバミル化反応の化学反応モデルとしてモノエタノールアミン（MEA）のカルバミル化に関するデータを用いた（McCann et al (2009) *J Phys. Chem*）。RuBisCO Lys201-NH_3^+のカルバミル化／脱カルバミル化による RuBisCO の活性化／不活性化の酵素反応キネティクスは Badger and Lorimer（Biochemistry (1981)）の結果を用いた。

[結果・考察] RuBisCO の CO_2 による活性化は次のように進行する。Lys201-NH_3^+＋CO_2 ⇄ Lys201-NH-COO^- (+ $2H^+$) ⇄ Lys201-NH-COO^-:Mg^{2+}。右向きの活性化反応ではアミノ基のカルバミル化が律速反応で、活性化キネティクス解析に使われた条件では活性化が終了するのに 10 分を要したが、MEA のカルバミル化反応はわずか 3.2 秒で終了した。この酵素の活性化は RuBisCO タンパク質の構造変化を伴うことが報告されている（Vater et al (1977) *BBRC*）。試験管中で CO_2 と Mg^{2+}で活性化した RuBisCO を EDTA を含む水で希釈した際の活性型酵素の半減期は 20 s だが、カルバミル化 MEA からの CO_2 遊離速度半減期は 23 ms であった。一方、0.1 mM 6-phosphogluconate (6PG)あるいは 0.2 mM NADPH は活性化型 RuBisCO を安定化し、EDTA を含む活性測定液で希釈した場合の活性半減期はそれぞれ 30 分と 5 分となった。6PG や NADPH は酵素上から取り除かれても RuBisCO が活性型構造を取り続ける、いわゆる形状記憶能力を有するために起きる現象だと考えている（Yokota (2017) *BBB* 81, 2039）。



RuBisCO, adaptation to environment, kinetics

発表責任者：横田明穂（yokota@bs.naist.jp）

講演番号：3A27a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A27 会場

大豆種子を用いた小麦種子貯蔵タンパク質の蓄積挙動の解析

Accumulation of wheat seed storage proteins in transgenic soybean seeds

○松岡 祐樹[1]、柳原 康希[1]、前田 紘夢[1]、奥田 英子[1]、山田 哲也[2]、裏出 令子[1]、丸山 伸之[1]([1]京大院農、[2]北大院農)
○Yuki Matsuoka[1], Kouki Yanagihara[1], Hiromu Maeda[1], Eiko Okuda[1], Tetsuya Yamada[2], Reiko Urade[1], Nobuyuki Maruyama[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】小麦種子貯蔵タンパク質は、グリアジンとグルテニンを主要な構成成分としている。それらは、プロリン残基とグルタミン残基を主とする繰り返し配列をもつ特徴的なタンパク質構造により特有の食品物性を示す。また、このような特徴的なタンパク質構造に基づく性質が細胞内における蓄積挙動に対して影響を与える可能性について示唆されている。小麦にはグリアジンとグルテニンに対する多くの分子種が含まれるため、単一の分子種の蓄積挙動を解析することは難しい。本研究では、大豆種子に小麦種子貯蔵タンパク質（α-グリアジンおよび高分子量グルテニン）を発現させた形質転換体を作製し、それらの蓄積挙動について解析した。
【方法】1) α-グリアジンおよび高分子量グルテニンに対する発現ベクターを構築し、大豆早生品種であるカリユタカを用いて[1)]、アグロバクテリウムによる形質転換を行った。アグロバクテリウム感染後、薬剤による選抜を行い、形質転換体を得た。2) ウサギを宿主動物としてα-グリアジンおよび高分子量グルテニンの組換えタンパク質に対する免疫処理を行い、抗α-グリアジンおよび高分子量グルテニン血清を調製した。3) SDS を含む緩衝液を用いて形質転換体の種子からタンパク質を抽出し、調製した抗血清に対するウェスタンブロット解析を行った。4) 形質転換体の種子を固定後、樹脂に包埋し、電子顕微鏡による細胞内構造の形態観察を行うとともに、抗血清を用いて解析した。
【結果】α-グリアジンを発現させた種子を用いたウェスタンブロット解析において、一次構造より推定される 33kDa 付近と、それよりもサイズの小さい位置に複数のバンドが検出された。一方、高分子量グルテニンを発現させた種子では、一次構造より推定されるサイズ付近に主なバンドが検出された。また、両発現タンパク質は、70%エタノールなどにより形質転換体の種子から抽出される傾向を示した。免疫電子顕微鏡観察による種子細胞におけるα-グリアジンの局在性の解析から、液胞中にα-グリアジンが蓄積していることが示唆された。高分子量グルテニンの局在については、現在解析中である。

・本研究において京都大学生存圏研究所・生態学研究センターDASH システムを利用した。

Reference
1) Yamada et al., Plant Biotechnology 27:217-220.

transgenic soybean, wheat storage protein, membrane traffic

講演番号：3A27a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A27 会場

イネ種子胚盤由来のカルスを材料とする無細胞翻訳系の構築

Establishment of a cell-free translation system based on rice-callus extracts

○鈴木 翔、近藤 久海香、松岡 聡、戸澤 譲 (埼玉大・院・理工)
○Kakeru SUZUKI, Kumika KONDO, Satoshi MATSUOKA, Yuzuru TOZAWA (Graduate School Sci Eng, Saitama Univ.)

【目的】　真核生物の細胞抽出液を用いた無細胞翻訳系は、細胞内とほぼ同等な状態を保持したタンパク質合成装置を利用するシステムである。様々なタンパク質の調製系として活用される一方で、翻訳反応に関与する翻訳因子やその修飾酵素の機能解析を行う系としても優れている。コムギ胚芽抽出液を利用する無細胞翻訳系は、機能型のタンパク質調製においては特に効率が良いシステムとして知られているが、個々の翻訳因子タンパク質の機能を分子レベルで詳細に解析する目的には、ゲノム情報が充実し、各種の変異株が揃い、さらに形質転換も可能なイネを材料とする系がより適していると考えられる。本研究では、ゲノム配列が決定されているイネ（*Oryza sativa*）日本晴を材料として、脱分化誘導により得られた種子胚盤由来の均一な細胞塊（カルス）を用いて細胞抽出液を調製し、これを基にした無細胞翻訳系の構築を目的として研究を進めてきた。

【材料及び方法】　脱分化培地において種子胚盤より誘導したカルスを同培地で２週間ごとに継代培養し、得られた均一なカルスを液体窒素を用いて凍結破砕し、超遠心分離法により S30 画分を得た。翻訳活性の測定は、Ω-GFP-mRNA を翻訳鋳型とし、アミノ酸基質に添加した[^{14}C]ロイシンのタンパク質への取込み率を求める方法により行った。GFP タンパク質の合成は、SDS-PAGE とオートラジオグラフィーにより確認した。さらに翻訳鋳型として poly(U)を用いた[^{14}C]フェニルアラニンの重合反応の解析により、ペプチド伸長反応活性の確認を行った。

【結果及び考察】　本研究において構築したイネカルスの無細胞翻訳系は、コムギ胚芽抽出液ほどの高活性は持たないものの、GFP 合成試験においては同様の反応液スケールでの継時的な翻訳反応の追跡が可能であった。さらに均一の細胞から比較的簡便に活性を保持する翻訳反応液が得られたことから、多くの主要作物を含む単子葉植物に普遍的に存在する翻訳因子群の解析に適するものと期待される。今後は反応液組成の至適化を図るなど、より効率の良い翻訳系への改善も目指してゆく予定である。

Cell-free, rice, translation

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3A27p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A27 会場

植物感染性線虫の誘引物質
Attractant for plant parasitic nematode
○大田 守浩[1]、橋口 正嗣[2]、明石 良[2]、石田 喬志[1]、井田 隆徳[2]、澤 進一郎[1] ([1]熊本大学、[2]宮崎大学)
○Morihiro Oota[1], Masatugu Hashiguti[2], Ryo Akashi[2], Takashi Ishida[1], Takanori Ida[2], Shinichiro Sawa[1] ([1]Kumamoto Univ., [2]Miyazaki Univ.)

植物感染性線虫の一種であるサツマイモネコブセンチュウは、様々な農作物に感染し、全世界で年間数十兆円の被害があると試算されている。

このサツマイモネコブセンチュウは、植物の根端付近から侵入して感染するが、根の位置を認識する為に、根から分泌される何らかの化合物を誘引物質として利用していると考えられる。しかし、これまでに植物由来の線虫誘引物質はまだ同定されておらず、深刻な線虫被害を抑えるためにも、その解明が急務である。

誘引物質を単離するために、本研究ではセイヨウミヤコグサの培養根より単離された Super root 系統を用いた。Super root は、地上部なしで(根のみ)で液体培養が可能で、植物ホルモン非存在下でも根だけで持続的に成長が可能である。我々は、Super root の培養液に線虫誘引活性が存在することを確認した。さらに、この培養液を様々なクロマトグラフィー等を用いて分離することにも成功しており、興味深いことに、線虫の誘引物質として 10 アミノ酸から成るペプチドが検出された。これらの事は、植物の根からは線虫を誘引するペプチドホルモンが分泌されている事を示唆している。

このような植物由来の線虫誘引物質に関する研究は、応用面だけではなく、未だ明らかになっていない、多細胞植物−多細胞動物間の交信(相互作用)に関する分子機構を明らかにするものであり、未知の生物間植物ホルモンの発見にも繋がる可能性がある。本発表では、我々の研究の現状について紹介し、線虫−植物間の宿主認識機構、および植物によって分泌される線虫誘引物質について、是非とも議論させて頂きたいと考えている。

Plant parasitic nematode, Attractant

発表責任者：大田守浩（126s6006.kumadai@gmail.com）

講演番号：3A27p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A27 会場

植物免疫活性化剤候補化合物の選抜と作用機構の解析
Screening and characterization of novel plant defense activators
○北畑 信隆[1]、斉藤 優歩[1]、中野 正貴[1]、諸橋 賢吾[1]、来須 孝光[2]、浅見 忠男[2]、朽津 和幸[1]([1]東京理科大・応用生物科、[2]東大院・農生科)
○NOBUTAKA KITAHATA[1], YUHO SAITO[1], MASATAKA NAKANO[1], KENGO MOROHASHI[1], TAKAMITSU KURUSU[2], TADAO ASAMI[2], KAZUYUKI KUCHITSU[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Univ. of Tokyo)

植物免疫活性化剤は、化合物自身に殺菌作用はないが、植物自身の免疫を亢進する作用を持つ化合物である。植物免疫活性化剤は、殺菌剤・殺虫剤が持つ問題を回避可能であるため、次世代型の農薬として注目されているが、これらの薬剤の効率的なスクリーニング系は未だ確立されていない。

卵菌由来のタンパク質性エリシターである cryptogein に対するタバコ培養細胞 BY-2 の応答は、植物免疫応答の優れたモデル系である。BY-2 細胞は cryptogein を受容すると、活性酸素種(ROS)の生成や防御応答遺伝子の発現、プログラム細胞死などの一連の防御応答を誘導する。我々は ROS の生成量と防御応答の強さに、正の相関関係があることに着目し、ROS の生成量を指標とした植物免疫活性化剤のスクリーニング系を構築した。この系は、96 ウェルプレート上ですべての操作を完結できるため、非常に簡便で効率的なスクリーニングが可能である。市販の 11,000 化合物を対象としてケミカルスクリーニングを行い、56 化合物を候補化合物として選抜した。

選抜した化合物が植物の病害抵抗性に与える影響を評価するために、いくつかの化合物を選び、化合物を前処理したシロイヌナズナのトマト斑葉細菌病菌に対する耐病性を調べたところ、化合物処理したシロイヌナズナで耐病性が亢進した。一方で、化合物は細菌の増殖に直接影響せず、殺菌活性を有していなかった。これらの結果は、構築したスクリーニング系で、効率的に植物免疫活性化剤の候補化合物が選抜できることを示唆している。

化合物がどのように植物の耐病性を亢進しているのか明らかにするために、微生物分子パターン(MAMP)である細菌鞭毛由来ペプチド flg22 によって誘導される一連の感染防御応答に対する化合物の効果を調べた。その結果、化合物処理により flg22 誘導性の ROS 生成や防御応答遺伝子の発現などが無処理に比べて亢進したことから、化合物は植物の基礎的抵抗性を増強することで、耐病性を亢進していると考えられた。

プロベナゾールなどの既知の植物免疫活性化剤は、植物免疫の主要経路であるサリチル酸経路を活性化することで、植物の耐病性を向上させることが知られている。このことは、プロベナゾールをサリチル酸シグナル欠損変異体 *npr1* へ処理しても、flg22 誘導性の ROS 生成が亢進しなかったことからも示された。化合物による MAMP 誘導性 ROS 生成の亢進に SA 経路が必要かどうか調べるために、化合物を *npr1* 変異体に処理した。その結果、*npr1* 変異体でも flg22 誘導性の ROS 生成を亢進したことから、化合物は、既存剤とは異なり、NPR1 を介さずに植物免疫を亢進している可能性が示唆された。

plant defense activator, chemical biology, pathogen

発表責任者：北畑 信隆（nobkitahata@gmail.com）

講演番号：3A27p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A27 会場

ブラシノステロイドによるプライミング誘導機構の解析

Studies on the mechanisms of brassinosteroid-mediated disease resistance in Arabidopsis

○草島 美幸、井上 真依、仲下 英雄（福井県大生）
○Miyuki KUSAJIMA, Mai INOUE, Hideo NAKASHITA (Fukui Pref. Univ.)

植物の病原体に対する応答は様々な植物ホルモンによって制御されている。全身的に誘導される抵抗性のうち詳細な解析が進められているものとして、サリチル酸やジャスモン酸を介して誘導される抵抗性があるが、これらは健全部位においても防御応答遺伝子が発現して病原菌の感染に備えている。これらとは別に、生育に正に働くブラシノステロイド（BR）を介して誘導される病害抵抗性 Brassinosteroid-mediated disease resistance（BDR）がイネ、タバコ、シロイヌナズナにおいて確認されている。BDR は病原菌の感染前には既知の防御関連遺伝子の発現を伴わない抵抗性であるが、BDR が誘導された植物では病原菌感染後の *PR-1* 等の防御関連遺伝子の発現上昇が早められている。したがって、BDR は通常の植物と比較して病原菌などのストレスに対して素早く応答可能なプライミング状態であると考えられる。一方、サリチル酸を介した全身獲得抵抗性では、その誘導時にアゼライン酸およびピペコリン酸がシグナル分子として働き、新たに感染した病原菌に対して素早く応答するプライミングにおいてもこれらの低分子化合物が関与することが知られている。BR によるプライミング誘導機構の解明を目的として、本研究では BDR によるプライミングにおけるこれらの低分子シグナル分子の機能を解析した。

培養土で生育させたシロイヌナズナ野生株（Col-0）に活性型 BR であるブラシノライドを灌注処理して BDR を誘導し、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000（*Pst*）を浸漬接種した後の遺伝子発現解析を行った。BDR が誘導された植物では、*Pst* 接種前にはアゼライン酸応答性遺伝子 *AZI1* およびピペコリン酸生合成遺伝子 *ALD1* の発現は上昇していないが、*Pst* 接種後には、*PR-1* と同様に *AZI1* および *ALD1* の発現誘導も早まることが明らかとなった。これらの結果から、アゼライン酸やピペコリン酸は BDR の誘導には関与しないが、BDR による病害抑制効果の発揮に関与する可能性があることが示唆された。現在、関連変異株を用いて BDR に対するこれらの低分子シグナル分子の影響の解析を進めている。

brassinosteroid, Arabidopsis, disease resistance

発表責任者：仲下英雄（nakashita@fpu.ac.jp）

講演番号：3A27p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A27 会場

植物共生微生物の定着によりトマトに誘導されるプライミングの解析
Studies on the mechanism of disease resistance induced by symbiotic microorganisms in tomato plants

○藤田 萌香[1]、草島 美幸[1]、加藤 久晴[1]、西内 巧[2]、仲下 英雄[1] ([1]福井県大、[2]金沢大)
○Moeka Fujita[1], Miyuki Kusajima[1], Hisaharu Kato[1], Takumi Nishiuti[2], Hideo Nakashita[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kanazawa Univ.)

植物に共生する微生物の中には宿主植物に病害抵抗性を誘導するものがあることが知られているが、その病害抵抗性のメカニズムの詳細は解明されていない。前年度大会において細菌エンドファイト *Azospirillum* sp. B510 株またはアーバスキュラー菌根菌(AMF) *Gigaspora margarita* が定着したトマトの地上部では病害抵抗性が誘導されることを報告した。この抵抗性は全身獲得抵抗性とは異なり、防御関連遺伝子の発現を伴わないプライミングであり、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*)の感染に対して強く応答して防御関連遺伝子を発現することが明らかになった。本研究では、植物共生微生物が宿主に誘導するプライミングのメカニズムを明らかにすることを目的として、AMF の定着により誘導されるプライミングに絞って解析を進めた。

AMF を処理したトマトに非病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (*Pso*)を接種して感染部位での遺伝子発現を経時的に解析した結果、AMF 処理区では無処理区に比べて PR 遺伝子の強い発現が認められ、プライミングが非病原性細菌に対しても効果があることが明らかとなった。また、フラジェリンを欠失した *Pso⊿fliC* 株を接種した場合にも同様の効果が認められ、プライミング効果の発動にはフラジェリンは必須ではないことが示された。次に、AMF によるプライミングに機能する遺伝子を見出すためにマイクロアレイ解析を行った。*Pst* 接種前および接種 12 時間後において共生微生物処理区特異的に発現が上昇する遺伝子をマイクロアレイにより選抜し、さらに経時的な遺伝子発現を解析した結果、プライミングの誘導および効果発動のそれぞれで特異的に発現が上昇する遺伝子を見出した。プライミングの誘導と効果発動におけるこれらの遺伝子の機能を解析することにより、プライミングの分子メカニズムの解明と効果的な病害防除技術の開発に有用な情報が得られると期待される。

disease resistance, endophyte, arbuscular mycorrhizal fungus

発表責任者：仲下英雄（nakashita@fpu.ac.jp）

講演番号：3A27p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A27 会場

AM 菌が分泌するヘテロキトオリゴ糖共生シグナルの糖鎖配列の決定
Induction of rice AM symbiosis-related genes by a heterochitooligosaccharide with defined sequence
○野島 耕陽、秋山 康紀（阪府大院・生命環境）
○Koyo NOJIMA, Kohki AKIYAMA (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は 80%以上もの陸上植物と共生関係を築く。AM 共生において，宿主植物と AM 菌はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。AM 菌が生産するシグナル物質は Myc factor と呼ばれ，現在までにリポキトオリゴ糖（Myc-LCO）とキチンオリゴ糖が報告されている。しかしながら，Myc-LCO とキチンオリゴ糖による共生応答誘導は部分的かつ限定的であることが明らかになってきており，真の共生シグナル物質が別に存在することが強く示唆されている。当研究室では，新たに，部分 *N*-脱アセチルキチン（partially *N*-deacetylated chitin, DAC）3 糖およびキトサン 3 糖がイネの根における AM 共生マーカー遺伝子の発現を顕著に誘導すること、さらにこれらオリゴ糖が AM 菌から実際に分泌されていることを見出している。DAC3 糖には糖鎖配列の異なる 6 種類の配列異性体が存在し，どの配列をもつオリゴ糖が共生シグナルとして機能しているかは明らかになっていない。本研究では，Myc factor 活性ヘテロキトオリゴ糖を同定するため, 特定の糖鎖配列をもつDAC3 糖を化学合成および酵素合成により個々に調製し，イネにおける AM 共生マーカー遺伝子の発現誘導活性を調べた。
【方法および結果】初めに 2 位のアミノ基が DMM(dimethylmaleoyl)基あるいはフタロイル基で保護された糖受容体と糖供与体をそれぞれグルコサミン塩酸塩から合成した。その後，グリコシル化反応，脱保護反応を経て，GlcN-GlcN-GlcNAc を合成した。また，キチン 3 糖の非還元末端の GlcNAc 残基を NodB により脱アセチル化することにより GlcN-GlcNAc-GlcNAc を得た。NodB (chitin deacetylase) は無細胞タンパク質合成システムにより C 末端 His タグ融合タンパクとして合成した。合成した 2 種類の DAC3 糖をイネ（*Oryza sativa* cv. Nipponbare BL2）の発芽 3～4 日後の実生に処理し，6 時間後の根における AM 共生マーカー遺伝子（*AM1, AM2, AM3, RAM1*）の発現量を qRT-PCR により測定した。その結果，GlcN-GlcN-GlcNAc では，*AM1* について発現量の顕著な増加が見られた。一方，GlcN-GlcNAc-GlcNAc ではマーカー遺伝子の発現はほとんど誘導されなかった。以上の結果は，特定の糖鎖配列を持つ DAC オリゴ糖が菌根共生遺伝子を誘導する共生シグナルとして働くことを示した初めての例である。現在, 菌分泌物から検出された DAC3 糖の糖鎖配列の詳細に調べるため LC-MS/MS 分析を行っている。

arbuscular mycorrhizal fungi, Myc factor, heterochitooligosaccharide

講演番号：3A27p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A27 会場

べと病菌感染時におけるブドウの防御応答関連遺伝子の発現解析

Transcriptional analysis of defense related genes in grapevines infected with downy mildew.

○清水 健雄、河野 淳、須崎 浩一（農研機構　果樹茶業研究部門）
○Takeo SHIMIZU, Atsushi KONO, Kouichi SUZAKI (Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO)

ブドウべと病は、国内外のブドウ生産に被害を与える重要病害であり、卵菌類に属するブドウべと病菌 *Plasmopara viticola* によって引き起こされる。近年、主要な薬剤に耐性を示すブドウべと病菌が国内で確認されており、べと病抵抗性ブドウ品種の育成が以前にも増して重要な課題となってきている。一方、ブドウにおいて、べと病に対する抵抗性が強い品種と弱い品種の存在が知られているが、現在のところ、その抵抗性機構の詳細は不明である。よって、ブドウにおいてべと病抵抗性関連遺伝子が見つかれば、抵抗性機構の解明や今後の抵抗性品種の育成に大きく貢献できると考えられる。

そこで、本研究では、べと病抵抗性が強いブドウ品種と弱い品種において、べと病菌接種時の防御応答関連遺伝子の発現変化を比較することにより、これらの遺伝子とべと病抵抗性との関連性を調べることを目的とした。

まず、ブドウべと病菌の接種方法を検討した。その結果、胞子のう懸濁液をスプレーで噴射する方法で、ブドウの葉の裏に均一にべと病菌を感染させることができた。この方法を用いて接種した各ブドウ品種の葉から、接種後 24 時間で RNA を回収し、これらを発現解析用のサンプルとして用いることにした。次に、Lenzi et al. Plant Cell Physiol. 57(1): 69-81 (2016) によって報告されている 6 種類の防御応答関連遺伝子のプライマーを用いて、各ブドウ品種の発現解析用サンプルから作製した cDNA をテンプレートとして PCR を行った。得られた PCR 産物の塩基配列を調べた結果、既知の防御応答関連遺伝子の塩基配列と高い相同性を示すことが明らかとなった。よって、これらの PCR 産物は、本研究で用いている各ブドウ品種において、注目している防御応答関連遺伝子の一部が増幅されたものであると考えた。そこで、これらの塩基配列データを基にプライマーを作製し、Realtime PCR を行い、各品種におけるこれらの防御応答関連遺伝子の発現変化を調べた。その結果、べと病抵抗性が弱いブドウ品種では、べと病菌の接種により防御応答関連遺伝子の発現が誘導されない、もしくは減少する傾向が見られた。一方、べと病抵抗性が強いブドウ品種では、べと病菌の接種により防御応答関連遺伝子の発現が誘導される傾向が見られた。

本研究で発現誘導が確認された防御応答関連遺伝子は、ブドウにおけるべと病抵抗性への関連が予想され、今後の研究を通じて、べと病抵抗性品種の育成に貢献できることを期待している。

Grapevine, Downy mildew, Defense related gene

講演番号：3A27p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A27 会場

葉面常在菌由来の分泌する生分解性プラスチック分解酵素は、植物表層を分解する
Concentrated esterase from the phylloplane yeast *Pseudozyma antarctica* degrade lipophilic layer of plant leaves.

○植田 浩一、黒瀬 大介、釘宮 聡一、光原 一朗、吉田 重信、田端 純、鈴木 健、北本 宏子（農研機構）
○ HIROKAZU UEDA, DAISUKE KUROSE, SOICHI KUGIMIYA, ICHIRO MITSUHARA, SHIGENOBU YOSHIDA, JUN TABATA, KEN SUZUKI, HIROKO KITAMOTO (NARO)

植物葉面には、様々な非病原性の微生物が常在している。これまでに我々は、葉面常在酵母や糸状菌から、生分解性プラスチック（生プラ）フィルム分解活性を持つ株を、容易に取得できることを見出した。このうち、イネ常在性の酵母（*Pseudozyma antarctica*）では、培地にキシロースを添加すると、強力な生プラ分解酵素（PaE）とキシラナーゼの分泌が誘導される。ジャー培養装置を用いたキシロースの流加培養で、高濃度の PaE とキシラナーゼを含む培養ろ液を得た。この培養ろ液を散布処理した葉は、表面を覆う脂質の層が薄くなるとともに、水分保持力が低下した。葉の表面は、微生物が利用できる栄養分が少ないと考えられているが、常在菌は葉の表層を分解する酵素を少量分泌して、栄養を得ている可能性がある。一方で、植物に特異的な病原性微生物を感染させる際に、本培養ろ液を同時に処理すると、速やかに発病度が上昇することから、植物病原菌を用いた生物学的雑草防除の補助剤として使用できることが示唆された。

今回は、植物表層に影響を与える酵素を明らかにするため、PaE とキシラナーゼを分離・精製した。PaE は、培養ろ液から生プラ成分を担体に用いたアフィニティクロマトグラフィによって精製した。キシラナーゼは、イオン交換と疎水性担体カラムを用いて分画、精製した。これらの精製酵素をトマト葉の表面に滴下すると、精製 PaE を含む処理によって、トマト葉のクチクラ層が有意に薄くなるが、キシラナーゼのみでは変化しなかった。クチクラ層は、植物の外敵からの物理的な防御壁として機能している。PaE によってクチクラ層の薄くなったトマトでは、トマトの病原菌である灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）に対する抵抗性が減少したが、キシラナーゼのみでは影響を与えなかった。これらの結果から、*P. antarctica* が分泌する PaE は、植物表層の分解に主要な役割を担うことを明らかにした。

phyllosphere, biodegradable plastic-degrading enzyme, cuticle layer

講演番号：3A27p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟北 A27 会場

イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析
Identification of bacterial effector proteins that inhibit rice immune responses

○川口 雄正[1]、古川 岳人[2]、仲 恭輔[1]、中村 みなみ[1]、山田 孝樹[2]、近藤 真千子[2]、蔡 晃植[1,2]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ)
○Takemasa KAWAGUCHI[1], Takehito FURUKAWA[2], Kyosuke NAKA[1], Minami NAKAMURA[1], Koki YAMADA[2], Machiko KONDO[2], Fang-Sik CHE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bio-Sci. Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Div. of Bio-Sci. Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.)

植物は多くの植物病原細菌に共通して存在するフラジェリンなどの病原体関連分子パターン（Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）を認識し、活性酸素の発生や免疫関連遺伝子の発現などの PAMP-triggered immunity（PTI）と呼ばれる免疫反応を誘導する。これに対して植物病原細菌は、自身の持つ Type III 分泌装置（Type III secretion system; T3SS）を介してエフェクタータンパク質を植物細胞内に分泌することで植物の免疫反応を抑制する Effector-triggered susceptibility（ETS）と呼ばれる機構を有している。このような ETS の機構を明らかにするために、まず、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* のイネ病原性 K1 菌株がイネの PTI を抑制するかどうかを調べた。K1 菌株をイネ培養細胞に接種し、イネ PTI 誘導活性を有するフラジェリンを処理したところ、フラジェリンによって誘導される活性酸素発生量が減少し、フラジェリンによって特異的に発現誘導される *OsPAL* の発現量も減少した。そこで、K1 菌株の PTI 抑制機構を調べるため、K1 菌株の T3SS 欠損株を作製し、この菌株の PTI 抑制活性を測定した。その結果、PTI の抑制が認められなかったことから、K1 菌株の PTI 抑制にはこの菌株の T3SS から分泌されるエフェクタータンパク質が関与する可能性が示唆された。そこで、K1 菌株に存在する ETS エフェクターを同定するために、K1 菌株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリを作製し、この中から ETS 誘導能を欠損した株を選抜することにした。作製したトランスポゾン挿入変異株 4,562 株をイネ培養細胞にそれぞれ接種し、3 時間後にイネ PTI 誘導活性を有するフラジェリンを処理して活性酸素発生量を測定することで、活性酸素発生の抑制能が低下した 156 株を得た。そして、これら変異株のトランスポゾン挿入部位を解析することで 68 個の遺伝子を同定した。次に、イネに感染した後に発現が増加する K1 菌株の遺伝子を RNA-seq で解析したところ、イネ細胞に感染した後に発現量が 5 倍以上に増加する 1,240 個の遺伝子を同定した。この発現上昇遺伝子の中にトランスポゾン挿入部位の遺伝子が 16 個存在していたので、これら遺伝子の T3SS 分泌予測を *in silico* で解析したところ、208 アミノ酸残基で構成される機能未知のタンパク質が T3SS から分泌される可能性が高いことが予測された。そこで、この遺伝子を *K1SF-1（K1 susceptibility factor 1）* と名付け、*K1SF-1* 破壊株を作製したところ、この変異株は ETS 誘導能を失っていた。以上のことから、この *K1SF-1* 遺伝子が新規の ETS エフェクターである可能性が高いことが示された。

plant, bacteria, immune response

講演番号：3A27p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟北 A27 会場

植物成長促進細菌 *Aquitalea magnusonii* H3 株によるコウキクサへの付着挙動の解析
Host colonization dynamics of *Aquitalea magnusonii* H3, a plant growth promoting bacterium of duckweed *Lemna minor*

○石澤 秀紘[1]、黒田 真史[1]、井上 大介[1]、森川 正章[2]、池 道彦[1] ([1]大阪大院・工、[2]北海道大院・環境)
○ Hidehiro ISHIZAWA[1], Masashi KURODA[1], Daisuke INOUE[1], Masaaki MORIKAWA[2], Michihiko IKE[1] ([1]Osaka Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】植物と共生する細菌群には、宿主の成長を促進／阻害するものが存在し、これらはそれぞれ PGPB(Plant Growth-Promoting Bacteria)、PGIB(Plant Growth-Inhibiting Bacteria)と呼ばれている。PGPB を接種することで植物の生産性を高める技術は古くから研究されているが、実用化のためには接種した PGPB が土着細菌との競争下において、持続的に植物と共生することが必要である。以前の研究において、新たに単離した PGPB と PGIB を同時にコウキクサに接種したところ、ほとんどの PGPB は PGIB の存在下で成長促進効果を失ったが、*Aquitalea magnusonii* H3 株は唯一、他のどの菌株と組み合わせた場合でも成長促進効果を示し、実用的な PGPB であることが示唆された(Ishizawa et al., 2017)。本研究では、こうした H3 株の植物成長促進能がコウキクサ根圏における強い競争力に起因するという仮説を立て、本菌株による植物体への付着挙動について検討を行った。

【方法】H3 株を懸濁させた培地でコウキクサを栽培し、栽培後の植物体より抽出した DNA をテンプレートとした qPCR によって H3 株の付着量を経時的に定量した。また、2 種類の PGIB (*Acinetobacter ursingii* M3 株、 *Asticcacaulis excentricus* M6 株)をそれぞれ 1:99 から 99:1 までの様々な比率で H3 株と混合して同様の実験を行い、競争条件における各菌株の付着量を定量した。

【結果】H3 株は単独で用いた場合、懸濁濃度の多寡によらず 24 時間以内に植物体 1 mg あたり 10^5~10^6 の付着細胞数に達し、それ以降も同様の付着量を示した。M3 株と混合して用いた場合、H3 株は M3 株の付着を著しく制限し、初期の混合比率が低い場合でも最終的にはより高い割合でコウキクサと共生していた。H3 株と M6 株を混合して用いた場合では、両菌株は初期の比率によらず概ね 1:1 の比率で植物表面において共存した。また、全ての条件において、H3 株は PGIB の成長阻害効果を打ち消し、コウキクサの生育を改善した。以上の結果より、H3 株は他の細菌が存在する条件でも高い比率でコウキクサに付着し、その結果として安定した成長促進効果を示すものと推測される。

本研究は、科学技術振興機構(JST)先端的低炭素技術開発(ALCA)「共生微生物を活用した水生バイオマスの効率生産」の一環として実施した。

plant growth-promoting bacteria, duckweed

講演番号：3A27p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟北 A27 会場

植物種の違いによる栽培土壌の菌叢変化
Changing of Bacterial Flora of Cultivated Soil
○浅見 綾香[1]、山﨑 透[2]、前田 憲慶[1]、荒木 希和子[1]、久保 幹[1] ([1]立命館大学 、[2]立命館大学大学院)
○Ayaka ASAMI[1], Toru YAMASAKI[2], Kazuyoshi MAEDA[1], Kiwako S. ARAKI[1], Motoki KUBO[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Ritsumeikan University.)

【背景・目的】 土壌環境は物理・化学的要素に加え、生息する昆虫、微生物などの生物的要素により構成されている。植物の成長や生存は土壌環境の影響を受ける一方、植物による栄養分の消費や有機物やアミノ酸・化学物質の放出が土壌中の微生物に影響する。このように両者は密接に関係しているため、特定の植物の連続的な栽培や、不適切な土壌管理が、土壌中の養分不足や微生物叢の偏りを生じさせ、植物の成長不良などを引き起こすと考えられている。特に、植物の根から数 mm 程度の土壌範囲は根圏土壌と呼ばれ、植物を栽培することで栽培作物特有の根圏微生物叢が形成されると推測される。しかし、植物の生育によって微生物を含めた土壌環境がどのように変化するか分かっていない。そこで、本研究では土壌細菌の挙動を解析することで、植物の成長による土壌の菌数および菌叢変化を知ることを目的とする。
【方法】 植物種の生育による菌叢の経時変化を知るために有機肥料を施肥した土壌をワグネルポットに入れ、シュンギク、コマツナ、クローバーを植物栽培室で 4 週間栽培した。植物の主根から 1~2 cm の範囲から土壌を採取し、1 週間ごとに総細菌数を測定した。また、16S rRNA を標的とした PCR-DGGE 分析を行い、土壌中の細菌の種数と菌叢の相同性を解析した。さらに、同一植物を長年栽培した野外の 2 圃場の土壌についても同様に総細菌数の測定と菌叢の解析を行った。
【結果・考察】 シュンギク、コマツナ、クローバーの栽培土壌について総細菌数を測定した結果、細菌数は栽培前では高い値（15.9×10^8 cells/g-soil）を示したが、4 週間後には値が低くなり（平均 5.2×10^8 cells/g-soil $\pm1.6\times10^8$）、植物種によらず全植物種で似た挙動を示した。PCR-DGGE 分析を行った結果、コマツナを栽培した土壌では、細菌の種数が 4 週間で 37 から 64 種に増加し、植物の栽培によって菌叢が変化したことが分かった。野外の 2 圃場の土壌では、総細菌数はいずれも低い値を示した。また、栽培前後の土壌の PCR-DGGE 分析を行うと、どちらも、栽培前と栽培後の土壌でバンドの著しい増減は見られなかったが、土壌によってバンドパターンが大きく異なることが確認された。今後、PCR-DGGE 分析によって分離したバンドの中で特徴的なバンドを切り出し、シークエンス解析を行い、植物種の違いやその成長過程で変化した菌種を特定する予定である。

bacterial flora, soil bacteria, rhizosphere

講演番号：3A28a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A28 会場

珪藻のシリカ形成機構解明に向けた *Nitzschia* 属珪藻の遺伝子組換え系の確立

Development of genetic transformation system for the diatoms *Nitzschia* sp. toward an understanding of silica biomineralization

根本 理子[1]、○白石 幸音[1]、田村 隆[1]、真山 茂樹[2]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院環境生命、[2]東京学芸大教)

Michiko NEMOTO[1], ○Yukine SHIRAISHI[1], Takashi TAMURA[1], Shigeki MAYAMA[2], Kenji INAGAKI[1] ([1]Okayama Univ., [2]Tokyo Gakugei Univ.)

【目的】珪藻の細胞壁は，シリカ（SiO_2）を主成分としており，複雑で種特異的な 3 次元ナノ・マイクロパターン構造を有している。この特徴を利用し，分子フィルター，ガスセンサー，固定化酵素の担体等，ナノテクノロジー分野への応用が検討されている。珪藻によるシリカ形成機構を解明できれば，その形成原理を模倣し，上記応用が可能な新しいセラミックス材料を合成できる可能性がある。我々は，細胞分裂速度が緩やかな中型～大型の珪藻を用いて，シリカ細胞壁が形成される過程をより詳細に観察することで，シリカ形成機構の解明を目指す研究を行っている。現在，環境中に多く生息する中型の *Nitzschia* 属珪藻を対象に解析を行っており，本研究では，研究の基盤技術となる遺伝子組換え系の確立を試みた。

【方法】他種珪藻の *fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein*（*fcp*）遺伝子配列を参考に設計したプライマーを用いて，珪藻 *Nitzschia palea* のゲノム中から *fcp* 遺伝子を増幅した。この遺伝子の上流及び下流配列を解析し，転写制御配列を含んだ推定プロモーター配列と推定ターミネーター配列を取得した。上記の配列を用いて，放線菌由来ゼオシン耐性遺伝子（*Sh ble*）と *gfp* 遺伝子を発現するプラスミド pNpfcp を構築した。1550 psi のガス圧力と直径 0.6 μm または 1.0 μm のタングステン粒子を用いて，パーティクルガン（Bio-Rad 社製）により pNpfcp を藻体に導入し，形質転換を行った。

【結果・考察】pNpfcp を導入した珪藻 *Nitzschia closterium* において，ゼオシン耐性を示すクローンが 10^8 細胞あたり約 20～30 個得られた。得られたクローンを観察したところ，GFP 蛍光が確認された。さらに，このクローンのゲノムに対し PCR を行ったところ，*Sh ble* 遺伝子と *gfp* 遺伝子の両方が増幅された。*N. closterium* は最大長径 30 μm を超える中型珪藻で，これまでに形質転換が行われた珪藻の中でも最大レベルのサイズである。また，pNpfcp を導入した珪藻 *Nitzschia* sp. NIES-3877 において，GFP の発現を示すクローンが確認された。上記結果より，*Nitzschia* 属珪藻の遺伝子組換え系が確立できたことが示された。

diatom, transformation, biomineralization

講演番号：3A28a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A28 会場

リシノール酸生産により促進される実用珪藻の脂質蓄積

Acceleration of lipid accumulation by production of ricinoleic acid in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*.

○本庄 智也[1]、梶川 昌孝[1]、伊福 健太郎[1]、菓子野 康浩[2]、福澤 秀哉[1]([1]京大 院 生命科学、[2]兵県大 院 生命理学)
○Tomoya HONJYO[1], Masataka KAJIKAWA[1], Kentaro IFUKU[1], Yasuhiro KASHINO[2], Hideya FUKUZAWA[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. life Science, Univ. of Hyogo)

微藻類を用いたカーボンニュートラルな有用物質の生産が期待されている。我々は医療から工業まで幅広く利用可能な有用脂肪酸であるリシノール酸（RA）に着目した。現在、RA はトウゴマのひまし油から生産されているが、トウゴマの種子には毒性タンパク質が含まれている点や輸入に依存した産業構造などの問題点があるため、他生物での生産が期待されている。我々は養殖業で利用されている珪藻ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* が RA の代替供給源として利用できる可能性を示し、麦角菌 *Claviceps purpurea* 由来の脂肪酸水酸化酵素（オレイン酸ヒドロキシラーゼ、FAH）をコードする遺伝子 *CpFAH* を野生型ツノケイソウで発現させることにより、細胞あたり 2.2 pg の RA が蓄積する RA 生産株（Cp4 株）の作出に成功した[1)]。この Cp4 株では TAG 蓄積量が野生型（WT）の 170%に増加していた[1)]。そこで本研究では、この Cp4 株の TAG 蓄積量をさらに増加させることを目的とした。

Cp4 株で TAG の蓄積量が増加した原因の 1 つとして考えられる TAG 合成の最終段階を触媒するアシル基転移酵素にまず着目した。そのアシル基転移酵素の候補遺伝子は他の生物種との相同性検索からツノケイソウにおいて 8 個見出された。Cp4 株が RA を蓄積する 15 ℃の培養 3 日目で *CpFAH* の mRNA レベルが約 8 倍に上昇した。この時アシル基転移酵素 DGAT1、DGTT1、PDAT1 の mRNA レベルが 2 倍以上に上昇した。これらの遺伝子をそれぞれパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において *CpFAH* と共発現させたところ、*PDAT1* の発現株において最も TAG 蓄積量が増加した。*CpFAH* を単独で発現させた株に比べ 9 倍に増加したので *PDAT1* がツノケイソウでも TAG 合成に大きく寄与すると示唆された。そこで、ツノケイソウにおいて光依存的な発現を示す集光性クロロフィル結合タンパク質をコードする *Lhcf4* 遺伝子プロモーター[2)]と、硝酸誘導性の発現を示す硝酸還元酵素をコードする *NR* 遺伝子プロモーター[2)]を用いて、WT と Cp4 株での *PDAT1* の過剰発現株を作出した。これらの株について、PDAT1 の活性上昇により RA を含む総 TAG 量が増加している可能性を検討した。

＜文献＞ [1]Kajikawa M. et al. *Sci. Rep.* 6：36809 (2016)
[2]Ifuku K. et al. *Photosynth. Res.* 123：203–211 (2015)

ricinoleic acid, lipid metabolism, microalgae

講演番号：3A28a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A28 会場

バイオ燃料生産性の向上を目指した光合成能およびワックスエステル生合成能強化ユーグレナの分子育種

Molecular breeding of Euglena enhancing capacity of photosynthesis and wax-ester biosynthesis for biofuel production

○田茂井 政宏[1,2]、岡村 桃子[1,2]、作山 治美[1,2]、小川 貴央[2,3]、石川 孝博[2,3]、重岡 成[2,3]（[1]近畿大農、[2]CREST/JST、[3]島根大生資科）
○Masahiro Tamoi[1,2], Momoko Okamura[1,2], Harumi Sakuyama[1,2], Takahisa Ogawa[2,3], Takahiro Ishikawa[2,3], Shigeru Shigeoka[2,3] ([1]Kindai Univ., [2]CREST/JST, [3]Shimane Univ.)

【目的】真核藻類であるユーグレナは、好気条件下では光合成産物としてパラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解してミリスチン酸（C14）とミリスチルアルコール（C14）からなるミリスチルミリステート（C28）を主成分とするワックスエステルを高生産する特徴を有する。我々はこれまでに、ラン藻のカルビン回路構成酵素である FBP/SBPase 遺伝子をユーグレナに導入することで、光合成機能が強化され、パラミロンおよびワックスエステル量が増加することを明らかにした（*Biotechnol. Biofuels* 8; 80）。しかしながら、独立栄養条件下で生育したユーグレナにおけるワックスエステル変換効率は従属栄養条件下のそれと比べて低かった。一方、ワックスエステル生合成経路の律速因子の一つと考えられるトランスエノイル CoA 還元酵素（EgTER1）をユーグレナに導入することによって、嫌気処理時のパラミロン分解速度が向上し、ワックスエステル量が増大した。そこで、ユーグレナでのワックスエステル生産性を向上させることを目的に、これら 2 つの遺伝子を同時に導入した形質転換ユーグレナを作出し、バイオマス生産性の評価を行った。
【方法と結果】ユーグレナ由来β-tubulin プロモーターに FBP/SBPase を、NAD^+-GAPDH プロモーターに EgTER1 遺伝子を連結したベクターを構築し、NEPA21 エレクトロポレーターを用いてユーグレナ野生株へ導入した。パロモマイシン添加 CM 培地によるスクリーニングを繰り返し、4 株の薬剤耐性株を取得した。薬剤耐性株からゲノムを抽出し、導入遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、FBP/SBPase 遺伝子および EgTER1 遺伝子の両方が導入されていることが確認された。これらの形質転換株では総 FBPase 活性が野生株の 1.3～1.5 倍に上昇していた。現在、種々の培養条件下でのパラミロン含量、嫌気処理時のパラミロン分解速度およびワックスエステル含量の比較を行っている。

Euglena, biofuel, transgenic

発表責任者：田茂井政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A28a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A28 会場

イネ科作物 HIS1 ホモログの試験管内機能改変による除草剤抵抗性遺伝子の創出

In vitro enzyme engineering of HIS1 homologs from gramineous crops for creating novel herbicide resistance genes

○高村 夏生[1]、武井 里美[2]、佐久間 望[1]、山崎 明彦[3]、関野 景介[3]、山田 祐司[3]、廣瀬 咲子[4]、大島 正弘[4]、吉田 均[4]、黒木 慎[4]、戸澤 譲[1,2] ([1]埼玉大・理、[2]埼玉大・院・理工、[3](株)エス・ディー・エス　バイオテック、[4]農研機構・生物機能部門)

○Natsuki TAKAMURA[1], Satomi TAKEI[2], Nozomi SAKUMA[1], Akihiko YAMAZAKI[3], Keisuke SEKINO[3], Yuji YAMADA[3], Sakiko HIROSE[4], Masahiro OHSHIMA[4], Hitoshi YOSHIDA[4], Makoto KUROKI[4], Yuzuru TOZAWA[1,2] ([1]Saitama Univ., [2]Graduate School Sci Eng, Saitama Univ., [3]SDS Biotech K.K., [4]NARO NIAS)

【目的】　*HIS1* は 4-HPPD 阻害型除草剤への抵抗性原因遺伝子として日本型イネに見出され、既知の除草剤抵抗性遺伝子との類似性がないイネ科植物に固有のタンパク質をコードしている。本研究では他のイネ科作物 HIS1 ホモログ（HSL）の機能を有効に利用するため、試験管内翻訳系を利用したタンパク質変異導入による酵素機能改変を進め、組換え植物の作出による除草剤抵抗性の検証を進めた。

【材料及び方法】　イネ HSL1 およびトウモロコシ HSL2 の 2 種の HIS1 ホモログタンパク質を対象に、HIS1 とのアミノ酸配列比較および三次元構造予測により、基質ポケット近傍のアミノ酸の置換変異を導入し、各タンパク質の酵素機能解析を進めた。インビトロで除草剤修飾の酵素機能が確認されたタンパク質については、これを発現するシロイヌナズナ組換え体を作出し、ベンゾビシクロン（BBC）ならびに BBC と同一作用機作で化学構造の異なる 4-HPPD 阻害型除草剤（Sulcotrione、Mesotrione、Tefuryltrione、Tembotrione）に対する抵抗性検定を実施した。

【結果及び考察】　アミノ酸配列でイネ HIS1 に高い相同性を示すイネ HSL1 に対し、HIS1 型アミノ酸へ変換する変異を導入した結果、修飾可能な除草剤の選択性が、変異部位特異的に変動することを見出した。さらに、加算的な変異集積に伴い、修飾可能な除草剤のスペクトラムが広がることを確認した。また、アミノ酸置換を導入した変異型トウモロコシ HSL2（ZmHSL2）が、野生型に比べ有意に BBC 酸化修飾活性を獲得していることをインビトロの酵素アッセイにより確認した。この変異型 ZmHSL2 を発現するシロイヌナズナ形質転換体は、感受性原品種が完全白化する BBC 濃度でも薬剤耐性を示した。

我々は以上の結果より、イネ科作物 *HIS1* ホモログ遺伝子の幾つかが、比較的少数のアミノ酸置換変異の導入でトリケトン系除草剤の不活性化修飾活性を獲得できることを示した。また、アミノ酸変異パターン依存的に特定薬剤への選択性を与えることが可能なことも明らかにした。さらに、トウモロコシについては独自遺伝子の改変によりイネ *HIS1* 同様な除草剤抵抗性遺伝子の創出が可能であることを示した。

rice, herbicide, transgenic

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3A28a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A28 会場

イネ科作物由来の HIS1 ホモログ遺伝子を発現する植物の除草剤耐性の解析

Characterization of herbicide resistance for plants expressing HIS1 homologue derived from gramineous crops

○モンドル 慶子[1]、高村 夏生[1]、村田 和優[2]、前田 英郎[3]、山崎 明彦[4]、関野 景介[4]、山田 祐司[4]、吉田 均[5]、廣瀬 咲子[5]、大島 正弘[5]、加藤 浩[6]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大理、[2]富山県・農林水産総合技術センター、[3]農研機構・中央研、[4]株)エス・ディー・エス　バイオテック、[5]農研機構・生物機能部門、[6]農研機構・作物開発センター)

○ Yasuko MONDORU[1], Natsuki TAKAMURA[1], Kazumasa MURATA[2], MAEDA MAEDA[3], Akihiko YAMAZAKI[4], Keisuke SEKINO[4], Yuji YAMADA[4], Hitoshi YOSHIDA[5], Sakiko HIROSE[5], Masahiro OHSHIMA[5], Hiroshi KATO[6], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Toyama Pref. AFFRC, [3]NARO CARC, [4]SDS Biotech K.K., [5]NARO NIAS, [6]NARO NICS)

【【目的】　植物の酵素 4-HPPD の機能を阻害するベンゾビシクロン（BBC）などのトリケトン系除草剤は、近年利用シェアが急速に拡大している。我々はこれまでに、インド型と日本型イネの交配で育種された特定イネ品種が BBC 感受性を示したことを契機に、日本型イネの二番染色体に座乗し、二価鉄イオン/2-オキソグルタル酸（2OG）依存型オキシゲナーゼをコードする *HIS1* 遺伝子が BBC 抵抗性原因遺伝子であると特定している。本研究では、HIS1 に相同性を持つタンパク質をコードするイネ科作物の *HSL*（*HIS1 like gene*）遺伝子を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製して、その除草剤抵抗性について解析を進めた。同時にイネの *HIS1* 欠損変異株と *HIS1*[+]野生株を対象として５種類のトリケトン系除草剤への抵抗性検定試験を実施した。

【材料及び方法】　カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター支配下で各種イネ科作物の *HSL*（*HIS1 like gene*）を発現するシロイヌナズナ（columbia）形質転換株を作出し、イネ *HIS1* 発現形質転換体および野生株をそれぞれ対照として、MS 培地を用いて種子を発芽させ、連続光照射条件下で、トリケトン系除草剤（BBC、Sulcotrione、Mesotrione、Tefuryltrione、Tembotrione）に対する抵抗性検定試験を行なった。さらに、イネ日本晴野生株および日本晴由来の *Tos17* 挿入型 *HIS1* 欠損株を対象として、30˚C、16h/8h 明暗条件下で、１葉期芽生えの上記の５種類のトリケトン系除草剤に対する抵抗性検定試験を実施した。

【結果及び考察】*HIS1* を発現するシロイヌナズナは、5 種類全てのトリケトン系除草剤に対して有意な抵抗性を示した。イネを含むイネ科作物由来の *HSL* 遺伝子発現個体には、*HIS1* 発現個体と異なる薬剤抵抗性スペクトラムが観察された。この結果を踏まえ、イネの *HIS1* 欠損変異株の除草剤抵抗性検定を再度詳細に行なったところ、*HIS1* 欠損株は *HIS1*[+]株との比較で 5 種類の除草剤に対して、シロイヌナズナ *HIS1* 発現個体とも異なる薬剤抵抗性スペクトラムを確認した。以上の結果は、イネ日本晴には、*HIS1* 以外にも除草剤抵抗性に大きく関与する遺伝子が存在することを示唆している。

rice, herbicide, transgenic

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3A28a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A28 会場

葉緑体「光スイッチ」を用いた物質生産に向けた活性型抗体可変断片 Fv の作製

Production of properly folded variable fragments of antibody to be expressed by "light-switch" in chloroplasts

○深澤 斗希也[1]、清水 正則[2]、伊藤 創平[1]、小林 裕和[1]([1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命、[2]常葉大・健康プロデュース)
○Tokiya Fukazawa[1], Masahiro Simizu[2], Sohei Ito[1], Hirokazu Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. Integrated Pharmaceutical Nutritional Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Health Promotional Sci., Tokoha Univ., Hamamatsu)

【背景・目的】

植物において遺伝子操作によりバイオ医薬品を生産し得るが、その種の異種成分の蓄積は植物の生育を阻害することが多い。本研究室では、植物の光傷害回避機構における光感知システムとして、光化学系 (PS) II に対して PS I をより励起する波長光が、PS I 反応中心タンパク質の遺伝子 (*psaA*) の発現を特異的に抑制することを見いだした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10760-10764, 2010)。この機構を外来遺伝子発現の「光スイッチ」として活用し、低コスト生産を目指し、葉緑体内でのバイオ医薬品生産を試みる。特許失効を迎えるバイオ医薬品のうちで販売実績が高い抗体薬 adalimumab（製品名：ヒュミラ；対象疾患：関節リウマチ、クローン病ほか）に注目し、これをモデル実験系とした。

【方法】

大腸菌と葉緑体のコドン使用頻度に合わせ、adalimumab の V_H 鎖と V_L 鎖をスペーサーで繋いだ一本鎖抗体（scFv）遺伝子を合成し、大腸菌で発現させた。この scFv とヒト TNFα 抗原との結合を評価するために、水晶振動子マイクロバランス法（QCM）を用いた。この scFv 遺伝子を葉緑体形質転換ベクターに導入し、パーティクルガン法により、タバコ葉緑体ゲノムに導入した。抗原結合部位の本来の高次構造の再現性における scFv の限界を考慮し、ヒト STAK4 (MST1) の SARAH（Sav/Rassf/Hpo）ドメインを活用した。大腸菌と葉緑体のコドン使用頻度に最適化した V_H-SARAH と V_L-SARAH の遺伝子を合成し、大腸菌で発現させた。

【結果】

大腸菌における可溶性タンパク質生産に実績がある pMAL 系ベクター (NEB) を用いた。しかしながら、合成されたタンパク質のほとんどが不溶性となったため、リフォールディング処理を実施した。これにより、scFv はヒト TNFα 抗原への結合能を発揮したが、その解離定数 K_d は adalimumab の 10 倍以上の高値であり、さらなる改善が必要であると判断された。一方、形質転換したタバコ葉からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE および HA-タグを用いたウェスタンブロッティングに供した。その結果、葉緑体内で scFv が合成されていることを確認した。大腸菌において、V_H-SARAH と V_L-SARAH を別々に発現させ、それらを *in vitro* で会合させることにより、ヘテロダイマー [SARAH-fused variable fragment dimer (SARAH-Fv)] が形成されるか検討した。

antibody, light-switch, chloroplasts

発表責任者：小林裕和（hirokoba@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A28a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A28 会場

BE 発現抑制による超高アミロース・コメデンプンの開発

Development of ultra-high amylose rice starch by suppression of BE gene expression

○後藤 大地[1]、阿部 克[1]、白鳥 龍一[1]、花城 勲[2]、中村 保典[3]、伊藤 紀美子[1,4] ([1]新潟大院・自然科学、[2]鹿児島大・農、[3]秋田県立大・生物資源、[4]新潟大・農)

○ Daichi GOTO[1], Katsumi ABE[1], Ryuichi SHIRATORI[1], Isao HANASHIRO[2], Yasunori NAKAMURA[3], Kimiko ITOH[1,4] ([1]Grad. Sch.& tech., Niigata Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Akita Pref. Univ., [4]Niigata Univ.)

デンプンは植物における貯蔵多糖であり、その主成分はアミロースとアミロペクチンである。アミロースはα－１，４グルコシド結合から成る直鎖状の分子であり、アミロペクチンはα－１，４グルカンがα－１，６グルコシド結合によって多数の分岐を持つ巨大分子である。トウモロコシには重量比率で７０～９０％の真のアミロース含量を持つ超高アミロースデンプンが存在するが、イネにおいてこのようなデンプンは知られていない。これまで、イネの *SSIIIa/BEIIb* 欠損変異体(1)や、RNAi 法によるオオムギの *BEIIa/BEIIb* 発現抑制系統(2)において、アミロース含量が増加することが報告されている。また、顆粒結合型デンプン合成酵素(GBSSⅠ)はアミロース合成とアミロペクチンの超長鎖形成に関与しており、見かけのアミロース含量を上昇させることが知られている。

そこで本研究では、超高アミロースデンプンを持つイネ系統を開発することを目的として、イネの *BE* 遺伝子の発現を抑制する RNAi ベクターを *GBSSⅠ* 欠損変異体ムサシモチ(*wx*)に導入した(*ΔBEs 系統*)。次に *ΔBEs* 系統を、*GBSSⅠ* をコードする *Wx* 遺伝子のうちインディカ型対立遺伝子である Wx^a を持つ系統と交配し、*ΔBEs/*Wx^a 系統を得た。

ΔBEs/Wx^a 系統の完熟種子から得た貯蔵デンプンを解析したところ、極めて高い見かけ上のアミロース含量を示した。また、電子線マイクロアナライザにより胚乳切片のデンプン粒の観察を行ったところ、*BE* の発現を抑制していない胚乳デンプン粒は比較的大きさや形の揃った形状をしており、隙間なくデンプン粒が詰まっていた。これに対し、今回開発した *ΔBEs/*Wx^a *系統*では大小不均一で丸い形状のしたデンプン粒が観察されるなど、ユニークな性質を示した。本発表では *ΔBEs/*Wx^a 系統のデンプンの性質の詳細な解析結果を報告する。

【参考文献】

(１) Asai, H. et al. *J. Exp. Bot.* **2014,** 65, 5497-5507

(２) Regina, A. et al. *J. Exp. Bot.* **2010**, 61, 1469-1482

high amylose starch, branching enzyme, granule-bound starch synthase 1

講演番号：3A28a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A28 会場

リグニン高含有イネを作る―イネ科バイオマス植物育種のモデル実験―

Molecular breeding lignin-enriched rice: a model experiment toward breeding gramineous biomass crops

○宮本 託志[1]、高田 理江[1]、鈴木 史朗[1]、飛松 裕基[1]、山村 正臣[1]、刑部 敬史[2]、坂本 正弘[3]、梅澤 俊明[1,4] ([1]京大生存研、[2]徳島大生物資源産業、[3]京大院農、[4]京大グローバル生存基盤)
○ Takuji MIYAMOTO[1], Rie TAKADA[1], Shiro SUZUKI[1], Yuki TOBIMATSU[1], Masaomi YAMAMURA[1], Keishi Osakabe[2], Masahiro SAKAMOTO[3], Toshiaki UMEZAWA[1,4] ([1]RISH, Kyoto U., [2]FBB, Tokushima U., [3]GSA, Kyoto U., [4]RUDGS, Kyoto U.)

【背景と目的】ソルガムやエリアンサスなどのイネ科バイオマス植物は、樹木よりも高いバイオマス生産性と優れた環境適応性を示すことから、リグノセルロース系バイオマス資源として期待されている。リグノセルロースの主要成分の一つであるリグニンは、多糖成分（セルロース・ヘミセルロース）の利用において、阻害要因として働くことが一般的に知られている。しかし一方で、リグニンは多糖成分と比べて高位発熱量が高く、バイオマスの直接燃焼利用においては有益な成分と考えられる。またリグニンは芳香族化学製品の原材料となり得る。したがって、リグニン含量の高いバイオマスは、燃料ペレットや芳香族化学製品の製造に有用であると考えられる。そこで我々は、リグニン高含有イネ科バイオマス植物の育種のための基礎知見を得ることを目的とし、モデル植物であるイネ（*Oryza sativa*）を用いて、リグニン含量を負に制御する転写因子（リプレッサー）の探索、及び CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いたリプレッサーへの変異導入によるイネのリグニン含量増加を試みた。

【方法、結果及び考察】シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）においてリグニン生合成のリプレッサーとして既報の MYB 及び WRKY 転写因子のアミノ酸配列を取得し、それらと高い相同性を示すイネのタンパクを探索したところ、OsMYB108、OsWRKY36、および OsWRKY102 が見出された。これらリプレッサー候補をコードする遺伝子に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて変異導入を行った。各リプレッサー候補遺伝子に変異導入が確認されたイネ個体と野生株を登熟まで栽培し、それらから細胞壁試料を調製し、チオグリコール酸リグニン含量測定を行ったところ、全てのリプレッサー候補遺伝子の変異導入イネで、野生株と比べて、茎のリグニン含量の有意な増加が見られた。この結果は、OsMYB108、OsWRKY36、および OsWRKY102 がイネ茎におけるリグニン生合成のリプレッサーであることを示唆している。現在、リグニン含量が増加したイネ個体について、詳細なリグノセルロース性状解析を行っている。

【謝辞】本研究は、JICA と JST の「地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS)」の支援のもとに行った。

Lignin, Rice, Transcription factor

発表責任者：梅澤俊明（tumezawa@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A28a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A28 会場

ソース/シンク同時強化サツマイモの作出とその評価

Genetic engineering of sweet potato for improving source and sink capacity

○冨本 優美[1]、田部 記章[2,5]、大鳥 久美[2,5]、菊池 彰[3,5]、田茂井 政宏[1,2,5]、横田 明穂[4,5]、重岡 成[1,2,5] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]筑波大・GRC、[4]植物ハイテック、[5]JST, CREST)
○ Yumi TOMIMOTO[1], Noriaki TANABE[2,5], Kumi OTORI[2,5], Akira KIKUTI[3,5], Masahiro TAMOI[1,2,5], Akiho YOKOTA[4,5], Shigeru SHIGEOKA[1,2,5] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ., [3]Tsukuba Univ. GRC, [4]PhiT, [5]JST, CREST)

【目的】近い将来、食糧や燃料が不足することが予想されており、遺伝子導入による高生産作物への期待が高まっている。イモ類は単位面積当たりの収穫量およびハーベストインデックスが栽培作物中でほぼ最大であることから、生産性向上のターゲット作物として適している。これまでに、カルビン回路で機能するラン藻 *FBP/SBPase* 遺伝子をサツマイモ由来ルビスコ（IbRbcS）プロモーター制御下で発現させることにより、ソース能を強化した形質転換サツマイモ(IbFS)を作出した。IbFS は、非組換え体と比較して光合成活性が 1.4 倍に上昇し、地上部の乾燥重量は 1.2 倍に増加していた。また、IbFS では節から形成される塊根の数も増加していた。本研究では、サツマイモバイオマスを更に増加させるために、野生種スイカより単離された *CLRan1* をシンク能強化遺伝子としてラン藻 *FBP/SBPase* 遺伝子と同時に発現させた形質転換サツマイモを作出し、バイオマス生産性の評価を行った。
【方法と結果】*CLRan1* をサツマイモの地下部に特異的に発現させるプロモーターを単離するために、サツマイモの茎および不定根原基の遺伝子発現を RNA-seq により解析した結果、plant AT-rich sequence and zinc-binding protein のサツマイモホモログ(*IbPLATZ*)が不定根原基特異的発現を示すことを明らかにした。そこで、*IbPLATZ* のプロモーター領域として開始コドン上流-2000 bp を単離し、下流に *GUS* レポーター遺伝子を連結してシロイヌナズナに形質転換した。形質転換シロイヌナズナにおける *GUS* の発現は根端特異的であり、特に根端に強く GUS の染色がみられた。そこで、*IbRbcS* プロモーター制御下で *FBP/SBPase* を、*IbPLATZ* プロモーター制御下で *CLRan1* を発現させる同時強化コンストラクトを作製した。アグロバクテリウムを介してサツマイモ茎頂分裂組織から誘導した胚性カルスへ導入し、カナマイシン添加培地でのスクリーニングを行った。その結果、得られた薬剤耐性カルスから、3 株の薬剤耐性株（IbFR）を取得した。3 株のうち 1 株について *FBP/SBPase* および *CLRan1* 遺伝子に特異的なプライマーを用いてゲノミック PCR を行った結果、IbFR 株では両遺伝子の導入が確認された。IbFR 株における FBPase 活性は非形質転換株の約 1.5 倍、光合成活性も 1.3 倍上昇していた。栽培一か月後の葉における糖含量を測定した結果、IbFR 株ではショ糖およびデンプン量もそれぞれ非形質転換株の 1.4 および 1.2 倍に増加していた。さらに、IbFR 株では根の発達が促進しており塊根数が増加していたことから、*FBP/SBPase* と *CLRan1* 導入の効果が現れていると考えられる。現在さらに収穫に向けた栽培を継続しており、ソース/シンク同時強化によるバイオマスへの影響を解析している。

sweetpotato, source/sink capacity, transgenic plant

講演番号：3A28a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A28 会場

ジャガイモへの多重遺伝子導入による光合成と塊茎形成能力の同時強化
Simultaneous enhancement of photosynthesis and tuber formation ability by introducing multiple genes into potato

○加藤 彰[1]、小川 太郎[1]、蘆田 佳子[1]、佐野 和子[1]、青木 洋代[1]、米光 歩[1]、渡邉 園恵[1]、重岡 成[2]、横田 明穂[1,3]([1]植物ハイテック研、[2]近畿大・農・バイオ、[3]奈良先端大)
○ Akira KATOH[1], Taro OGAWA[1], Keiko Ashida[1], Kazuko SANO[1], Hiroyo AOKI[1], Ayumi YONEMITSU[1], Sonoe WATANABE[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Akiho YOKOTA[1,3] ([1]Plant Hi-Tech Inst., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]NAIST)

【目的と背景】
重要な作物であるジャガイモのソース能力とシンク能力を強化することにより、塊茎収量を増やす技術を確立することを本研究の目的とした。カルビンサイクルの律速酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)と sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)の両反応を触媒するラン藻由来の *FBP/SBPase* 遺伝子をタバコで発現させると光合成能力（ソース能力）が増加し、植物体生産量が増すことが報告されている。そこで、ソース能力を高めるために *FBP/SBPase* をジャガイモに導入することを計画した。野生種スイカの根は乾燥ストレス下で急速に発達する。我々はこの現象に *CLRAN-GTPase1*(*CLRAN1*)遺伝子が関わることを明らかにしている(Akashi *et al*. Biosci. Biotech. Biochem. 2016)。*CLRAN1* をジャガイモに導入すると塊茎数が増加したので、シンク能力を高めるために *CLRAN1* もジャガイモに導入することを計画した。
【方法と結果】
はじめに、*FBP/SBPase* を単独でジャガイモに導入した。プロモーターは光依存性のタバコ *rbcS* プロモーターを用いた。組織にアグロバクテリウムを感染させてカルスを得て、それから再生した 200 個以上のシュートから、*FBP/SBPase* の発現レベルと FBPase 活性量を指標に 2 ラインを選抜した。しかし、塊茎収量は非形質転換ライン(NT)と変わらなかった。次に、*FBP/SBPase* と *CLRAN1* を同時にジャガイモに導入することを考えた。それに先立ち、*CLRAN1* が塊茎数を増加するメカニズムを解析した結果、*CLRAN1* 導入ジャガイモでストロン数が増加すること、一方、ストロン発達時にジャガイモ内生 *RAN1* の発現量が急激に増すことを見出した。これらのことから、内生 *RAN1* がストロン発達を経て、塊茎形成に関与することとこの作用を導入 *CLRAN1* が強化すると考察した。これを踏まえて、内生 *RAN1* と時間的、空間的に同調して発現させることを期待して *CLRAN1* をジャガイモ内生 *RAN1* プロモーターの下流に連結した。さらに、*5'-UTR* とターミネーターには高発現型のものを用いた。これを *FBP/SBPase* 発現コンストラクトの下流に連結して、ジャガイモを形質転換した。30 個程度のシュートから FBPase 活性量を指標に 2 ラインを選抜したが、このうちの 1 ラインは NT より塊茎収量が高い形質を示した。以上の様に、ソースとシンクの能力を同時強化することにより塊茎収量を増加することに成功した。
本研究は、CREST、JST の支援を受けたものである。

Solanum, FBP/SBPase, RAN-GTPase

発表責任者：横田　明穂（yokota@bs.naist.jp）

講演番号：3A28a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A28 会場

独自のベクターと高密度水耕栽培法を活用したゲノム編集によるコメ品質関連遺伝子の多重改変

A trial to improve rice quality by using an original genome editing vector and a method for high-density crop hydroponics in a plant incubator

○黒田 昌治、山口 知哉、山川 博幹（農研機構中央農研北陸拠点）
○Masaharu Kuroda, Tomoya Yamaguchi, Hiromoto Yamakawa (NARO Cent. Agric. Res. Cent.)

我々は、以前に開発した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を基盤とした独自のイネ用ゲノム編集ベクターセットを作製し、ゲノム編集によるコメの品質改良を目指している。アミラーゼ遺伝子はイネゲノムに8コピー存在するが、その中のいずれかが登熟期の高温によるコメ品質低下の要因になっていると推測された [2]。まず遺伝子間で共通するアミノ酸配列部分を標的とした1つのguide RNAで複数種のアミラーゼ遺伝子の破壊を試みたが、想定した編集個体はほとんど得られなかった。そこで、1遺伝子ごとに特異的guide RNAを設計して複数のguide RNAを導入する方法に切り替えて、ベクターセットの構造もそれにあわせて改良した。このベクターを用いたモデル実験として、イネ貯蔵タンパク質である10kDaプロラミンと16kDaプロラミンの多重破壊を試みたところ、両遺伝子が同時破壊された系統が得られた。現在、アミラーゼ遺伝子についても複数破壊に再挑戦している。

一方で、作物は植物体が大きくて種子の収穫まで時間がかかるため、ゲノム編集研究を行うには隔離温室等の設備的ハードルが研究発展の阻害要因となる。そこで我々は、簡便に植物体を高密度に水耕栽培する方法（Single-tube hydroponics）を開発した[3][4]。この方法を使えば、1台の植物インキュベータを上下に2分割して生育段階の異なる植物体を配置することにより、床面積（50cm x 50cm）あたり144個体、上下合計で288個体を同時栽培できる。元々イネ用に開発した本方法は、畑作物や野菜類の栽培にも活用できる汎用性があることを確認しており、例えばダイズの場合は上下合計で72個体を同時栽培できる。ゲノム編集研究をはじめとした基礎研究全般において、初期世代の選抜や冬場の世代促進など、多様な場面で極めて有用である。

[1] Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351
[2] Hakata M.(2012) Plant Biotechnol. J. 10, 1110-1117
[3] Kuroda M.(2015) Biosci. Biotechnol. Biochem.79, 63-67
[4] http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14_s11.html

水耕栽培法については、マニュアル等による技術移転にも対応しており、ご興味のある方は発表者（kurodama@affrc.go.jp）までお問い合わせください。

rice, genome editing, hydroponics

発表責任者：黒田昌治（kurodama@affrc.go.jp）

講演番号：3A28a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A28 会場

コムギにおける *in planta* ゲノム編集技術の開発

Development of *in planta* genome editing technology in wheat

濱田 晴康[2]、LIU Yuelin[1]、LINGHU Qianyan[1]、柳楽 洋三[2]、三木 隆二[2]、田岡 直明[2]、○今井 亮三[1] ([1]農研機構生物部門、[2]（株）カネカ)

Haruyasu HAMADA[2], Yuelin LIU[1], Qianyan LINGHU[1], Yozo NAGIRA[2], Ryuji MIKI[2], Naoaki TAOKA[2], ○Ryozo IMAI[1] ([1]NIAS, NARO, [2]Kaneka Co)

作物の形質転換やゲノム編集は通常カルス培養や組織培養を必要としており，培養特性や再分化効率等の優れた特定の品種に実施範囲が限定されるのが大きな問題である．コムギにおいても，一部の外国品種のみが形質転換可能あり，国産主要品種における形質転換成功例は殆どない．一方，組織培養を経ず，植物体の状態で形質転換を行う，いわゆる *in planta* 法がシロイヌナズナで確立されているが，作物における成功例は極めて少ない．我々は，コムギを材料に，国産実用品種にも適用可能な再現性の高い形質転換法（*in planta* particle bombardment（iPB)法）を開発した（Hamada et al. *Sci Rep* 2017)．そこで，本研究では，iPB 法をゲノム編集に適用したコムギ *in planta* ゲノム編集技術の確立することを目的とした．

iPB 法は吸水後のコムギ種子を供試し，実体顕微鏡下で胚より鞘葉および葉原基を取り除き，茎頂分裂組織を露出させる．切り取った胚をプレート上に並べ，DNA を付着させた金粒子を茎頂 L2 層に存在する生殖系列細胞をターゲットにパーティクルガンで導入する．撃ち込み後の胚より植物体を成長させ，PCR による遺伝子導入個体の選抜後，次世代に遺伝する種子を選抜する．iPB 法は，形質転換体作製以外にも，一過的発現系としても利用できることに着目し，CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を試みた．変異導入遺伝子としては千粒重に関わる *TaGASR7* を選択し，これに対してデザインされた gRNA 及び Cas9 遺伝子を導入マーカー（GFP）遺伝子と共に金粒子にコートしてパーティクルガンを用いて種子胚茎頂に導入した．ボンバードした 210 個の胚から生育させた植物個体のうち，11 個体（5.2%）で目的部位に変異が検出され，3 個体（1.4%）で変異の次世代への遺伝が観察された．遺伝分離後の T1 世代において，A，B，D ゲノムの全 *TaGASR7* 遺伝子が変異し，完全にノックアウトされた個体が複数得られた．また，得られた変異体について，Cas9，gRNA 遺伝子断片の挿入は検出されなかった．以上の結果から，種子胚茎頂の L2 細胞において，導入した CRISPR-Cas9 遺伝子の一過的発現による変異が誘導され，花粉等生殖細胞を経て，次世代に変異が遺伝することが明らかとなった．

iPB 法はコムギに以外にも多様な作物品種に適用可能であり，RNP やタンパク質の導入も可能であることから，次世代作物ゲノム編集技術として有望である．

genome editing, wheat, particle bombardment

発表責任者：今井亮三（rzi@affrc.go.jp）

講演番号：3A28a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A28 会場

CRISPR/Cas9 を用いた *Jatropha curcas* L. のゲノム編集の試み
Genome editing in *Jatropha curcas* L. using CRISPR/Cas9 system

○藤波 友樹[1]、児玉 岳[2]、十川 太輔[1]、松川 哲也[1]、大和 勝幸[1]、梶山 慎一郎[1] ([1]近畿大学院生物理工、[2]近畿大学生物理工)
○ Tomoki FUJINAMI[1], Takeshi KODAMA[2], Taisuke TOGAWA[1], Tetsuya MATSUKAWA[1], Katsuyuki YAMATO[1], Shin'ichiro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Grad. Sch. Kindai Univ., [2]BOST, Kindai Univ.)

【背景および目的】

Jatropha curcas は、トウダイグサ科に属する中南米原産の落葉低木で、その種子には、重量比にして約 40-60 %の流動性に富む中性油脂を含んでおり、比較的やせた土壌でも生育可能なことから、食料生産と競合しない次世代植物バイオディーゼル原料作物として有望視されている。しかしながら、現在各地で試験栽培等に用いられている *J. curcas* は、生産性や耐候性、さらには、主として本植物が産生するホルボールエステル類に起因する毒性の削減といった点で最適化されたものではなく、分子育種等による優良栽培品種の作出が求められている。　一方、近年、植物を含めた様々な生物種において CRISPR/Cas9 system によるゲノム編集技術の適用例が報告され、本技術を用いた遺伝子のノックアウトおよびノックインにより品種改良が可能であることが示されてきている。　そこで本研究では、ゲノム編集による *J. curcas* の優良品種作出に向けたモデル実験として、色素生産能の差異により表現型の解析が容易な phytoene desaturase (PDS) 遺伝子の CRISPR/Cas9 system を用いたノックアウトを試みた。

【方法および結果】

CRISPR/Cas9 system を用いたゲノム編集では gRNA 発現用のプロモーターとして U6 プロモーターがよく用いられている。そこで、発現を最適化する目的で *Jc* U6 プロモーターの単離を行った。*J. curcas* ゲノムとモデル生物ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*) U6 snRNA 配列との比較によって *J. curcas* には少なくとも 5 つの U6 プロモーター領域が存在することが示唆された。そのうち TATA box が高度に保存されていたものを *J. curcas* ゲノムから単離し、バイナリーベクターpDe-CAS9 に組み込んだ。標的配列は off-target 効果が最小と考えられる配列を 3 種類選び、*Jc* PDS 遺伝子破壊用 gRNA を設計した。完成したベクターは *Agrobacterium* EHA105 株に導入し、*J. curcas* 未熟子葉と共にアセトシリンゴンを含む共培養培地に置床した。共培養から 3 日後 *Agrobacterium* を滅菌したのちカルス分化用培地に置床し、約 2 週間後にカルスの生育が確認できた葉切片を選抜薬剤として bialaphos を含むシュート分化用培地に置床した。現在、PDS が破壊され白化したと考えられる株が得られており、本発表ではそれらの解析結果について報告する。

Jatropha curcas L., CRISPR/Cas9, genome editing

講演番号：3A28a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A28 会場

植物ゲノム編集ツール、Emerald Gateway TALEN system の改良とその評価
Evaluation of the improved Emerald Gateway TALEN system for plant genome editing.
○小野寺 瞳[1]、堀江 峻晃[1]、紀平 望帆[1]、青木（無津呂） 裕美[2]、草野 博彰[3]、今村 智弘[4]、寺村 浩[1]、島田 浩章[1] ([1]東京理科大・生物工、[2]現、理研・環境資源科学研究センター、[3]現、京大・生存圏研究所、[4]現、石川県立大)
○Hitomi ONODERA[1], Takaaki HORIE[1], Miho KIHIRA[1], Hiroi AOKI (MUTSURO)[2], Hiroaki KUSANO[3], Tomohiro IMAMURA[4], Hiroshi TERAMURA[1], Hiroaki SHIMADA[1] ([1]Dept. of Biol. Sci & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]CSRS., Riken., [3]RISH., Univ. Kyoto., [4]Ishikawa Prefectural Univ.)

ゲノム編集技術の一つである TALEN は、標的とする配列において DNA の切断を引き起こす人工ヌクレアーゼである。1 対の TALEN を標的配列の近傍に結合させることで、この部位の 2 本鎖 DNA を特異的に切断し、これによりこの部位に変異を導入することが可能である。TALEN は「配列特異性が高くオフターゲットが起こりにくい」、「標的配列の選択に自由度が高い」特徴を持つ。我々は、これまでに Gateway システムを利用した植物用 TALEN ベクターの簡便な構築システム：Emerald Gateway TALEN システムを開発している（Kusano H. et al., Sci. Rep. 6., 30234(2016)）。このシステムでは、エントリーベクターを導入した標的結合部位に対応する 2 つの *TALEN* 遺伝子を、2 ヶ所の attR 部位を持つデスティネーションベクターに LR clonase 反応により取り込ませ、対となる TALEN を有するバイナリープラスミドを構築する。

本研究では、デスティネーションベクターの改良を行った。まず、*TALEN* 遺伝子の 5’非翻訳領域にイネの *OsMac3* 遺伝子より得られた翻訳エンハンサーdMac3 配列を組み込んだ。これにより、*TALEN* 遺伝子は、翻訳エンハンサーの働きにより翻訳が促進されて、タンパク質の生産量の増加が見込まれた。次に、プロモーターを薬剤誘導型のプロモーターに置換した。これにより、薬剤による誘導型発現が可能な TALEN ベクターを構築した。改良型デスティネーションベクターを利用してイネのプロテアーゼ遺伝子を標的とする *TALEN* 遺伝子を構築した。これを、イネ培養細胞に導入した。選抜した形質転換細胞からゲノム DNA を抽出し、標的部位に存在する制限酵素切断部位を利用した変異の検出を行ったところ、変異が生じた細胞を得ることができた。薬剤誘導型のプロモーターを用いた *TALEN* 遺伝子を導入した形質転換体では、選抜時に薬剤を投与した形質転換体のみで変異体が得られた。さらに、翻訳エンハンサーを組み込んだ形質転換体では、顕著に高い頻度で変異が生じていた。このことから、このシステムは TALEN を用いた変異体を創出することに有用であることが示唆された。

（本研究の一部は内閣府イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」（生研センター）によって実施された。）

Plant molecular biology, Genome editing, TALEN

発表責任者：島田 浩章（shimadah@rs.noda.tus.ac.jp）

講演番号：3A28a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A28 会場

ゲノム編集によるジャガイモ CYP88B1 遺伝子の破壊

Disruption of potato *CYP88B1* by genome editing technology

○安本 周平[1]、李 ヒョン宰[2]、秋山 遼太[2]、澤井 学[1]、島津 知華[1]、關 光[1]、梅基 直行[3]、水谷 正治[2]、斉藤 和季[3]、村中 俊哉[1]（[1]阪大院・工、[2]神戸大院・農、[3]理研・CSRS）
○Shuhei Yasumoto[1], Hyoung Jae Lee[2], Ryota Akiyama[2], Satoru Sawai[1], Chika Shimadzu[1], Hikaru Seki[1], Naoyuki Umemoto[3], Masaharu Mizutani[2], Kazuki Saito[3], Toshiya Muranaka[1]（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [3]CSRS, RIKEN）

[背景]

ジャガイモ（ナス科）はステロイドグリコアルカロイド (SGA) と呼ばれる特化代謝産物を産生する。SGA は動物に対して毒性を示し、えぐ味を与えるため、SGA 量を低減したジャガイモの育種が進められてきた。しかし、ジャガイモ栽培品種の多くは四倍体であるため、従来の交配育種によって SGA を低減した品種を作出することは困難であった。SGA は共通の前駆体であるコレステロールが酸化、アミノ転移、糖転移などの反応を受けて生合成されており、私たちはこれまでに複数の SGA 生合成酵素遺伝子の同定、機能解析を進めてきた。コレステロール生合成酵素遺伝子である *SSR2* を人工制限酵素 TALEN を用いて破壊したところ、SGA の大幅な減少が確認され、ゲノム編集による代謝改変技術が四倍体ジャガイモの育種においても有用な手法であることが明らかとなった。*CYP88B1* は他の SGA 生合成酵素遺伝子と共発現しており、RNAi 法によるノックダウンによって SGA 量の減少とステロイドサポニンの蓄積が確認されているが、その酵素機能は明らかとなっていない。

[方法・結果]

ジャガイモ SGA 生合成経路に関わることが知られている *CYP88B1* を標的配列とする TALEN を設計し、植物における恒常発現ベクターを作製した。発現ベクターを導入した *Agrobacterium tumefaciens* をジャガイモ（cv. Sassy）茎切片へ感染させた。生育した再分化個体について標的配列への変異導入確認をヘテロ二重鎖移動度解析（HMA）で行ったところ、複数の再分化個体において変異導入を示唆する結果が得られた。再分化個体を生育後、ゲノム DNA を精製し、標的配列の塩基配列を確認した。このうち、6 ラインのサンプルからは変異が導入されていない *CYP88B1* が検出されず、目的のノックアウト体が得られたと考えられた。無菌的に生育させたゲノム編集個体について、SGA 含量を測定したところ、α-solanine、α-chaconine といった SGA が検出されず、代わりに窒素原子を含まない有用ステロイドサポニンの蓄積が確認された。先行研究における *SSR2* の破壊ではパラログ遺伝子である *SSR1* がコードする弱いコレステロール生合成酵素活性のため、SGA を完全に消失させることはできていなかったが、*CYP88B1* を標的とすることで SGA 量を検出限界以下とすることに成功した。現在、花粉稔性の高い他のジャガイモ品種においても *CYP88B1* の破壊を進めている。

本研究の一部は内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

potato, genome editing, steroidal glycoalkaloid

発表責任者：村中俊哉（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A28p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A28 会場

組換えタンパク質生産における一過的発現システムの改良

Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants

○三浦 謙治[1]、星川 健[1]、山本 剛史[1]、江面 健太郎[1]、岡澤 梨沙[1]、藤田 聡[1]、高岡 美予[1]、フー メイソン[2]、江面 浩[1] ([1]筑波大学生命環境、[2]アリゾナ州立大学)
○ Kenji MIURA[1], Ken HOSHIKAWA[1], Tsuyoshi YAMAMOTO[1], Kentaro EZURA[1], Risa OKAZAWA[1], Satoshi FUJITA[1], Miyo TAKAOKA[1], Hugh S. Mason[2], Hiroshi EZURA[1] ([1]University of Tsukuba, [2]Arizona State University)

組換えタンパク質生産において、効率的で大量発現が可能な発現システムが必要とされる。これまで植物におけるタンパク質発現は形質転換体を作出してから発現量の高いものを選抜するという方法が採られてきた。この場合、作出までに時間がかかるとともに、サイレンシングにより発現量が少ないということが良く見受けられる。一方で、一過的発現システムでは、形質転換体を作出する必要がなく、時間的に短縮できるという利点があるが、大量のタンパク質発現まで至っていないことが問題であった。我々は、一過的発現システムを改良することで、大腸菌での発現システムに匹敵する発現量を達成することを可能とした。この発現システムではジェミニウイルスレプリコンをもとにターミネータをタンデムにつなぐことでより高い発現量を達成できることが明らかとなった。さらに、この発現システムでは一過的発現で良く用いられているベンサミアナタバコのみならず、トマト、ナス、トウガラシ、メロン、レタス、コチョウランにおいても一過的に発現させることが可能である。これらの結果から、植物におけるタンパク質生産の有効な方法であることが示された。

transient expression system, double terminator, plant cells

発表責任者：三浦　謙治（miura.kenji.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A28p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A28 会場

膜交通を利用したプラスチドタンパク質蓄積技術の開発：TMN1 のプラスチドターゲティング機構
Development of Plastid Protein Accumulation Technology Utilizing Membrane Traffic: Mechanism of Plastid Targeting of TMN 1

○三ッ井 敏明[1,2]、河田 圭介[2]、新井 琢也[1]、古賀 彩[1]、高松 壮[2]、猪俣 拓也[2]、金古 堅太郎[2]、バスラム マロワン[1]（[1]新潟大農、[2]新潟大自然研）
○Toshiaki Mitsui[1,2], Keisuke Kawata[2], Takuya Arai[1], Aya Kitajima-Koga[1], Takeshi Takamatsu[2], Takuya Inomata[2], Kentaro Kaneko[2], Marouane Baslam[1] ([1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】プラスチドとは、葉緑体、アミロプラストやプロプラスチド等の総称であり、植物細胞に存在する特有なオルガネラである。プラスチドは独自の DNA を有するが遺伝子の数は限られており、このオルガネラの分化・機能発現は細胞核ゲノム遺伝子にコードされた機能タンパク質がプラスチドに輸送・局在化することによって導かれる。プラスチド外から移入される多くのプラスチドタンパク質はトランジットペプチドを持つ前駆体として合成され、この前駆体はプラスチド包膜に存在する Toc-Tic 複合体という膜透過装置によってプラスチド中へ輸送される。しかし近年、膜交通を介するプラスチドへのタンパク質輸送経路の存在が明らかになってきた（1-3）。我々は、Toc-Tic システムと膜交通システムを駆使したイネ胚乳細胞のアミロプラストに効率的に且つ大量にタンパク質を蓄積させる技術の開発を進めている。今回は、膜交通システムの一翼を担うトランスメンブレン 9 ファミリータンパク質 1（TMN1）のプラスチドターゲティング機構を報告する。
【方法と結果】TMN1-GFP を用いたイメージング解析から、TMN1 は細胞内膜系とプラスチドに局在し、分泌経路からプラスチドに輸送・局在化することを見出した。TMN1 のプラスチド局在性は、イネ、タマネギ並びにシロイヌナズナ細胞で確認された。イネ TMN1 の配列の中で、プラスチド局在化に必要な領域を決定するため、完全長 TMN1、TMN1 断片（⊿635-646, ⊿610-646, ⊿572-646, ⊿537-646, ⊿505-646, ⊿451-646, ⊿419-646, ⊿381-646, ⊿349-646, ⊿285-646, ⊿41-646 ）、TMN1(Y351A)、TMN1(F359L, M366L, I367L, V370I) 変異遺伝子と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子との融合遺伝子を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在性を解析したところ、第 2 トランスメンブレンドメイン (TMD2) を含むペプチド領域（348-380）が TMN1 のプラスチド局在化に必要であることが明らかになった。さらに、TMD2 がプラスチドターゲティングシグナルとして必要・十分に機能することを確かめるために、TMD2-GFP 遺伝子をタマネギ細胞に導入・発現させ、そのプラスチド局在化能を評価したところ、確かに、TMD2 がプラスチド局在化能を有することが分かった。

本研究は、科研費（15H02486）および EIG CONCERT-Japan (JST)の支援によって実施された。

1) Villarejo A et al. (2005) *Nat Cell Biol* 7:1224–1231, 2) Nanjo Y et al. (2006) *Plant Cell* 18:2582–2592, 3) Kitajima A et al. (2009) *Plant Cell* 21:2844–2858.

membrane traffic, plastid, TMN1

発表責任者：三ツ井敏明（t.mitsui@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A28p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A28 会場

水耕栽培により得られた桑根抽出液の機能性について

Study on functionality of mulberry root extracts obtained by hydroponics

○関 慎太郎[1]、深井 隆稔[2]、神戸 隆介[3]、木下 明[4]、本間 知夫[1,2]([1]前橋工科大院生物工学、[2]前橋工科大生物工学、[3](株)神戸万吉商店、[4]ハイトカルチャ(株))
○ Shintarou SEKI[1], Takatoshi FUKAI[2], Ryusuke KANBE[3], Akira KINOSHITA[4], Tomoo HOMMA[1,2] ([1]Maebashi Inst. Technol. Grad. Sch., [2]Maebashi Inst. Technol., [3]Kanbe Mankichi Inc., [4]Phytoculture Control Co.,Ltd)

【目的】
桑の葉や根は古くから漢方や生薬として利用されているが、現在でもその効能を期待して桑葉を加工した桑茶や桑粉末が売られている。桑根の需要もあるものの、木を掘り上げてしまうと再び植え直さなければならず、そして大きくなるまで待たなければならない。そこで本研究では桑根を採取することを目的として、桑苗の水耕栽培を行うこと、そして採取した桑根の機能性について調べた。
【方法】
＜桑苗の水耕栽培＞2016 年 3 月に桑枝の挿し木を行い、生育した苗(以後、挿し木苗と表記)を 8 月に掘り上げ、決まった成分を含む水耕液を満たした循環式水耕栽培セット(日本医科器械 WCU-1)に移植した。また、桑種子をシャーレ上で発芽発根させた苗(以後、種子苗と表記)をセラミック管(ハイトカルチャ製)に固定し、セラミック菅は水耕液に浸して静置させて苗を生育させた。苗がある程度の大きさに生育したら循環式水耕栽培セットに移植した。それぞれの苗において、伸長した根は回収し、一部を冷凍保存、残りは 70℃で一晩乾燥後に保存した。
＜桑根抽出液の調製＞乾燥保存した根の一部を乳鉢で磨り潰し、根の 9 倍量の熱水を加えて 5 分間放置後、遠心した上清を集めて桑根抽出液(10 倍希釈液)を得た。実験により抽出液はさらに希釈した。
＜桑根抽出液中の成分分析＞桑に特異的に含まれる機能性成分である 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)の含有量を HPLC にて、総ポリフェノール量をフォーリン・チオカルト法で測定した。
＜桑根抽出液の機能性＞当研究室で測定している美白効果を桑根抽出液の機能性の 1 つとして調べた。メラニン合成酵素であるチロシナーゼの活性に対する桑根抽出液を添加した場合の阻害率を調べ、美白効果として評価した。なお既存の美白成分としてよく利用されるコウジ酸を対照とした。
【結果】
挿し木苗では水耕栽培開始約 1 ヶ月後に白色根が旺盛に伸長し、根回収後も再び発根した。根量は元の苗の大きさに依存した。種子苗は挿し木苗に比べ成長のバラつきは少ないものの成長が遅く、根量は少なかった。桑根抽出液中の DNJ 含有量は採取時期で異なり、夏の種子苗で得られた根で最も多かった(0.214 mg/g 根)。総ポリフェノール含有量は採取時期による違いは見られなかった(9.2～10.2 mg/g 根)。桑根抽出液の美白効果は 20 倍希釈液で約 90%弱と極めて高い阻害率を示した。現在、さらに安定して根を得るための栽培条件、その他の機能性についても検討しているところである。

mulberry root, hydroponics, whitening effect

発表責任者：本間知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A28p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A28 会場

イネ由来 XIP 型キチナーゼ様タンパク質（OsXIP）のキシラナーゼ阻害活性評価

Inhibitory activity of endo-ß-1,4-xylanase from Rhizopus oryzae by chitinase-like xylanase inhibitor protein from rice.

○田中 盾、大沼 貴之（近大院農）
○Jun TANAKA, Takayuki OHNUMA (Kindai Univ)

【目的】キチン加水分解酵素であるキチナーゼ(EC3.2.1.14)はキチンのβ-1,4 結合を加水分解する酵素であり、糖質関連酵素の CAZy (http://www.cazy.org/)においてファミリーGH18 と 19 に分類されている。GH18 は様々な生物種に見いだされる一方、GH19 は植物をはじめ一部の細菌に限定されている。主要作物であるイネのゲノム DNA 上には、35 個の GH18 キチナーゼ遺伝子が存在していることが報告されている。しかし、イネにおいて多数存在するキチナーゼ遺伝子にコードされるそれぞれのタンパク質がどのような酵素学的性質を示し、どのような生理学的な機能を担っているのかについてはよくわかっていない。アミノ酸配列のアライメント解析からイネが有する GH18 キチナーゼの多くが、加水分解活性に重要なアミノ酸残基が他に置換されており、キチナーゼ活性を示さないキチナーゼ様タンパク質であることが示唆された。このようなキチナーゼ様タンパク質の役割として、最近、植物病原菌が分泌するキシラナーゼを阻害する XIP（Xylanase Inhibitor Protein）としての機能が報告されている。本研究では、イネが有する XIP 型キチナーゼ様タンパク質（OsXIP）とイネ立ち枯れ病菌 *Rhizopus oryzae* が生産する GH10 と GH11 キシラナーゼ（RXyn1 と RXyn2）の組換え型酵素を用いて、OsXIP による両酵素の阻害活性評価を行った。

【方法】大腸菌発現系によって組換え型 OsXIP と RXyn を発現させ、各種カラムクロマトグラフィーを用いて SDS-PAGE で均一なまでに精製した。OsXIP の RXyn 阻害活性は、キシラン寒天培地を用いたゲル内拡散法によって調べた。また、50 %阻害濃度（IC_{50}）および阻害定数（K_i）の決定は基質に 4-Nitrophenyl-β-xylobioside （*p*NP-X_2）を用いて行った。さらに等温滴定型熱量計（ITC）を用いて、OsXIP と RXyn2 の相互作用に伴う熱力学的パラメーターを決定した。

【結果】キシラン寒天培地を用いたゲル内拡散法の結果、OsXIP は RXyn2（GH11）に対する阻害活性を示したが、RXyn1（GH10）を阻害しないことがわかった。このことから、OsXIP は GH11 に分類されるキシラナーゼを特異的に阻害することが示唆された。OsXIP の RXyn2 に対する IC_{50} と K_i はそれぞれ 0.35 μM と 0.42 μM であり、OsXIP による RXyn2 の阻害はμM レベルであることがわかった。ITC による OsXIP と RXyn2 の相互作用解析により、両者は 1：1 の結合比で結合し、結合におけるギブスの自由エネルギー変化（Δ*G*）、エンタルピー変化（Δ*H*）、エントロピー変化（-*T*Δ*S*）はそれぞれ -11.0、-5.3、-5.7 kcal/mol であり、結合にはエンタルピー変化とエントロピー変化の両方が寄与していることがわかった。

chitinase, xylanase inhibitor protein, rice

講演番号：3A28p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A28 会場

側枝形成を制御する糖シグナリング因子の探索

Analysis of sugar signaling factors involved in regulating shoot branching

○大鳥 久美[1,2]、中西 宏樹[1]、田部 記章[1,2]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]JST,CREST）
○Kumi Otori[1,2], Nakanishi Hiroki[1], Noriaki Tanabe[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2]（[1]Kindai Univ., [2]JST,CREST）

【目的】これまでに、ショ糖生合成系の律速因子である細胞質型 FBPase を強化した形質転換タバコ TcFS やシロイヌナズナ AcF は、高 CO_2 環境下においてショ糖とヘキソース量の増加と共に、側枝数が野生株より増加することを明らかにしてきた（*Photosynth. Res.* 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017）。側枝形成は植物ホルモンを介して BRC1 によって統合的に制御されていると考えられており、高 CO_2 環境下の AcF では、オーキシン、ストリゴラクトン、サイトカイニン関連遺伝子および側枝形成を抑制する TCP 転写因子ファミリー遺伝子（*TCP18/BRC1*）の発現量が変化していた。これらの結果は、AcF では糖バランスの変化が植物ホルモン代謝関連遺伝子および *BRC1* の発現を制御し、茎数の増加につながったことを示唆していた。実際に、通常 CO_2 環境下で栽培した野生株へのショ糖・ヘキソース処理によっても、AcF と同様にこれらの遺伝子発現は影響を受けた。そこで本研究では、糖バランスによる側枝形成の制御機構を明らかにするために、*BRC1* 遺伝子発現を制御する糖シグナリング因子の探索および機能解析を試みた。【方法と結果】植物ホルモンとの関係が示唆されている糖シグナリング因子である糖トランスポーター1(STP1)、ヘキソキナーゼ 1(HXK1)、細胞壁インベルターゼ 6（CWINV6)、糖トランスポーター13(STP13)の遺伝子破壊株（*stp1-1, hxk1-1, cw-inv6, stp13*）を単離した。通常 CO_2 環境下で 4 週間水耕栽培した後、グルコースおよびショ糖を各 50 mM 含む水耕液で 24 時間処理した。各植物体の基部から mRNA を単離し *BRC1* 遺伝子発現量を解析した結果、野生株で見られる糖処理による発現抑制が、*stp1-1* では見られなかった。このことから、*STP1* が *BRC1* 遺伝子発現を制御する糖シグナリング因子の一つであることが示唆された。STP1 は H+/ヘキソース共輸送する糖トランポーターであるため、STP1 単独で BRC1 遺伝子発現を制御しているとは考えにくい。現在、酵母ツーハイブリッド法により STP1 と共に機能する糖シグナリング因子の探索を試みている。

branching, plant hormone, sugar signaling

講演番号：3A29a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟北 A29 会場

植物 5-アミノレブリン酸トランスポーターの機能
Function of 5-aminolevulinate membrane transporters in Arabidopsis
○金丸 研吾[1,2]、中来田 卓磨[1]、田中 節彦[1]、坂本 みのり[2]、黒田 修司[3]、宇野 知秀[1,2] ([1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]神戸大自)
○Kengo Kanamaru[1,2], Takuma Nakakita[1], Takahiko Tanaka[1], Minori Sakamoto[2], Shuji Kuroda[3], Tomohide Uno[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. Agri., Kobe Univ., [3]OAST, Kobe Univ.)

5-アミノレブリン酸 (ALA) は，アミノ酸の一種でありテトラピロール化合物合成経路の共通前駆体である。根や葉から植物に ALA を与えると，投与濃度により成長促進効果から光傷害誘導による枯死効果まで観察される。また予め ALA 投与した植物は環境ストレス耐性が向上する。我々は新規植物活性化剤としての ALA の用途開発を視野に ALA に関する分子生理作用とその機構の基礎研究を進めている。そのうち本発表では，ALA の生理効果を最大化するための基盤知見となると考えられる ALA トランスポーター(ALT)について報告する。

植物に高濃度 ALA を投与し，強光下に置くと葉緑体内代謝物による ROS 発生と光傷害の促進により植物は枯死する。このことを利用し，シロイヌナズナで 20 以上の膜輸送体候補遺伝子の T-DNA 挿入変異株を確立して高濃度 ALA と強光でも枯死しなくなるものをスクリーニングした。その結果，ALT1 から ALT3 候補遺伝子が得られた。そこで，各 ALT 変異株につい ALA 投与後の植物体内 ALA 量の変動を地上部と根，明暗条件に分けて HPLC 測定した。また，細胞内局在性が不明の ALT3 について GFP 融合タンパクを一過的発現させ蛍光顕微鏡観察をした。さらに，ALA 投与で誘導されるストレス耐性向上が変異株で減弱するかどうか，ALA で誘導される遺伝子の感受性変化も検証した。

その結果， 各 ALT 変異株では ALA を投与したときの ALA 蓄積量が地上部と根，明暗条件で互いに異なることがわかった。また ALT3 は ALT1,2 と同じく細胞膜に局在することが示唆され，HPLC 測定の結果等と合わせて，各 ALT の機能について考察する。

5-aminolevulinate, Arabidopsis, transporter

発表責任者：金丸研吾（kng@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A29a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟北 A29 会場

4-ヒドロキシ-5-アミノ-バレリン酸（HAVA）によるシロイヌナズナの遺伝子発現応答

Gene expression response to 4-hydroxy-5-aminovaleric acid (HAVA) in Arabidopsis

○岩村 咲良[1]、田中 節彦[1]、坂本 みのり[2]、黒田 修司[3]、斉藤 優[4]、池田 智明[4]、渡邊 繁幸[4]、宇野 知秀[1]、金丸 研吾[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]神戸大自、[4]コスモ石油)
○Sakura IWAMURA[1], Takahiko TANAKA[1], Minori SAKAMOTO[2], Suji KURODA[3], Masaru SAITO[4], Tomoaki IKEDA[4], Shigeyuki WATANABE[4], Tomohide UNO[1], Kengo KANAMARU[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. Agri., Kobe Univ., [3]OAST, Kobe Univ., [4]COSMO OIL CO. LTD.)

大部分の生物が一次代謝系で合成するアミノ酸で, ヘムやビタミン B12, 植物のクロロフィルといったテトラピロール類の合成基質となる 5-アミノレブリン酸（ALA）は，動物に投与すると貧血改善効果等，植物に投与すると成長促進効果等が見られ，食品添加物や肥料としての利活用が進んでいる。さらに植物への ALA 投与は生物的，非生物的ストレスの両方に対する耐性を向上させることが見出されているが，分子機構の詳細は不明な点が多い。一方，光合成細菌や ALA 発酵生産において，ALA 近縁物質である 4-ヒドロキシ-5-アミノ-バレリン酸（HAVA） が合成，蓄積することが報告されている。しかし，HAVA 合成酵素と反応経路，分子機能や生理活性については全く不明である。

そこで今回我々は HAVA による「正」と「負」の遺伝子発現応答を解析した。近年，植物では「負」の遺伝子発現制御によって「正」の生理応答を誘導する機構が他の生物よりも発達していることが明らかになりつつあり，両方を調べることで，統合的に作用点が見いだせると考えた。

HAVA を投与したシロイヌナズナのマイクロアレイ解析から，発現が上昇した「正」の遺伝子群と低下した「負」の遺伝子群を抽出した。次に定量 RT-PCR によってこれら「正」と「負」の遺伝子群を､代謝解析データベース KEGG およびシロイヌナズナ共発現データベース ATTED-II で解析した。これらのデータを以前から解析を進めている ALA による遺伝子発現制御系と比較して，共通点と相違点を検討し，HAVA による遺伝子発現応答について考察した。

4-hydroxy-5-aminovaleric acid, Arabidopsis, Gene expression

講演番号：3A29a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟北 A29 会場

塩基性 helix-loop-helix 転写因子 bHLH101 が関与する光酸化的ストレス応答機構の解析

Clade Ib basic helix-loop-helix transcription factor, bHLH101, acts as a regulatory component in photo-oxidative stress responses

○田部 記章[1]、野志 昌弘[2]、高木 優[3]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1]([1]近畿大・農・バイオ、[2]和歌山信愛・生活・食栄、[3]埼玉大・環境セ)
○ NORIAKI TANABE[1], MASAHIRO NOSHI[2], MASARU TAKAGI[3], MASAHIRO TAMOI[1], SHIGERU SHIGEOKA[1] ([1]Kinadi Univ., [2]Wakayama Shin-ai Col., [3]Saitama Univ.)

【目的】植物にとって過剰な光エネルギーの供給は葉緑体内で H_2O_2 に代表される活性酸素種(ROS)を生じさせる。ROS は強い細胞毒性を示す一方で、近年ではストレス防御応答を誘導するシグナル因子としても機能していることが報告されている。当研究室では、チラコイド膜に局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(tAPX)の発現抑制系を用いた解析により、葉緑体 H_2O_2 特異的に応答を示す遺伝子を同定してきた。これら遺伝子の多くは、転写因子やシグナル伝達物質の制御因子をコードしていた。これら遺伝子の破壊株および発現抑制株を用いたストレス耐性試験により、葉緑体からのシグナル制御に重要なコンポーネントと考えられる遺伝子の同定を試みている。そのうち、basic Helix-Loop-Helix 転写因子ファミリーに属する bHLH101 の優性抑制株がパラコートに対して感受性を示すことを見いだした。bHLH101 は植物特有の clade Ib に属しており、他にも bHLH038、bHLH039、および bHLH100 がこの clade に分類される。これらは鉄欠乏下において発現誘導され鉄欠乏応答を正に制御することが報告されている。本研究では clade Ib のうち、bHLH101 が特異的に葉緑体 H_2O_2 シグナルを介したストレス応答機構に関与していることを明らかにした。
【結果】bHLH101 の葉緑体 H_2O_2 シグナルへの関与を確認するために、エストロゲン処理により tAPX の発現を抑制させ葉緑体に H_2O_2 を蓄積させた葉における bHLH101 の発現変化を解析した。その結果、bHLH101 の転写レベルは tAPX の抑制に伴い抑制されていたが、他の clade Ib 遺伝子の発現量に変化は認められなかった。次に bHLH101 優性抑制株のパラコート感受性が生育環境中の鉄濃度に影響されるかを明らかにするために 100 μM(鉄十分条件)および 5 μM (鉄欠乏条件) での酸化ストレス耐性能を解析した。鉄欠乏条件において bHLH101 優性抑制株は顕著なクロロシスを示し、その形質は酸化ストレスによりさらに促進された。一方で、鉄十分条件では bHLH101 優性抑制株は酸化ストレスを与えた場合のみ葉の黄化の形質を示した。さらに、bHLH101 優性抑制株のパラコート感受性に他の clade Ib が関与していないことを確認するために、T-DNA 挿入によって bHLH101 が欠損した変異株(*bh1h101*)のストレス感受性を解析した。強光条件下で 2 週間生育させたところ、*bh1h101* 株のイオン漏出量は野生株より有意に増加していた。また、鉄の取り込みと ROS 応答のクロストークを明らかにするために、tAPX 発現抑制株における鉄還元酵素活性を測定した。その結果、tAPX 発現抑制株の鉄還元酵素活性はコントロール株より高かった。これらの結果は、葉緑体での H_2O_2 蓄積は、bHLH101 を介した根での鉄取り込みを正に制御していることを示唆していた。

Arabidopsis thaliana, photo-oxidative stress, bHLH transcription factor

講演番号：3A29a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟北 A29 会場

細胞内鉄恒常性に関与するシロイヌナズナ bHLH11 転写因子の解析

Functional analysis of transcriptional repressor bHLH11 involved in iron homeostasis in Arabidopsis

○野沢 昂太郎[1]、田部 記章[1]、野志 昌弘[2]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1] ([1]近畿大、[2]和歌山信愛大)
○ Kotaro NOZAWA[1], Noriaki TANABE[1], Masahiro NOSHI[2], Masahiro TAMOI[1], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Kinai Univ., [2]Wakayama Shin-ai Col.)

【目的】鉄は植物の生育に必須な必須微量元素であり、その欠乏はクロロシスにつながる。土壌中に存在する鉄の多くは難溶解性であり、植物は直接細胞内に取り込むことができない。そのため、シロイヌナズナなどの双子葉植物は、鉄還元酵素およびトランスポーターを用いた鉄取り込み機構を発達させてきた。双子葉植物における鉄取込み系の鍵因子は FIT と呼ばれる転写因子であり、その直接的な発現制御因子として多数の bHLH 型転写活性化因子が同定されてきた。しかしながら、過剰な鉄の取り込みは細胞内に活性酸素種を生じさせるなど生育に負の影響を与えることから、細胞内鉄恒常性は厳密に制御される必要がある。我々はこれまでに、bHLH11 の恒常的発現株および優性抑制株は、低濃度鉄培地上で矮性/子葉黄化を示すことを見いだした。そこで bHLH11 の鉄代謝における機能について解析した。
【方法・結果】低濃度鉄培地上における bHLH11 恒常的発現株および優性抑制株でみられる生育阻害は、鉄添加培地に移すことにより回復した。また、低濃度鉄培地上での bHLH11 恒常的発現株および優性抑制株における鉄還元酵素活性は、野生株と比較して低下していた。また、鉄取り込みの鍵因子である FIT の発現も野生株と比較して抑制されていた。これらの結果は、bHLH11 は鉄取り込みを負に制御する転写因子であることを示唆している。そこで、bHLH11 の転写活性化能を酵母 one-hybrid 法により解析したところ、転写活性化ドメイン VP16 を融合させた bHLH11 を導入した酵母のみ、栄養要求性培地での生育が認められた。また、VP16 融合 bHLH11 を恒常的に発現させたシロイヌナズナは、bHLH11 恒常的発現株および優性抑制株でみられた低濃度鉄培地の表現系を示さなかった。これらの結果からも、bHLH11 は転写抑制因子であることが示唆された。次に bHLH11 による転写制御機構を明らかにするために、酵母 two-hybrid 法を用いて bHLH11 の相互作用因子の探索を行った。一次選抜培地および二次選抜により 4 クローンを得た。それぞれのクローンに含まれる遺伝子の配列を解読した結果、3 クローンは putative myosin heavy chain をコードする遺伝子であり、残りは bHLH clade IVc をコードする転写因子であった。現在これらのタンパク質と bHLH11 が相互作用することで、どのように鉄代謝に関与するのかを詳細に解析している。

Arabidopsis thaliana, iron metabolisms, bHLH transcription factor

講演番号：3A29a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟北 A29 会場

被覆栽培したチャの被覆解除後の光照射に対する応答

Stress response of shade-grown tea leaves to illumination of high light after removal of shading

○森田 重人[1,2]、濵野 奈津[1]、長田 充洋[3]、竹本 哲行[3]、佐野 智[1]、増村 威宏[1,2]([1]京都府大生命環境、[2]京都農技セ生資セ、[3]京都農技セ農林セ)
○Shigeto MORITA[1,2], Natsu HAMANO[1], Mitsuhiro NAGATA[3], Tetsuyuki TAKEMOTO[3], Satoshi SANO[1], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center, [3]Agr. Forest. Technol. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center)

【目的】玉露や抹茶などの高級緑茶は、新芽（頂端部の芽と展開中の葉）の生育中に茶樹を遮光する被覆栽培により生産される。被覆をすることによって、弱光条件で栽培することで、茶葉の旨味成分が増加し高品質な茶が得られる。一方、被覆栽培したチャは、収穫時に強光に曝されることでストレスを受け一過的に障害を受ける。このようなストレスは、複数年にわたる長期間の被覆栽培によって生じるチャの樹勢低下や収量減少の一因と考えられる。上記の状況を背景として、我々は圃場において被覆栽培したチャのストレス応答を解析している。これまでの研究では、茶葉として収穫する新芽をサンプルに用いて解析を行ってきたが、長期間の連続被覆栽培による茶樹への影響を明らかにするには、新芽の収穫後に残った葉（古葉）を調べる必要がある。そこで本研究では、古葉における被覆栽培後の光照射の影響を調査した。

【方法と結果】茶樹に遮光率 85%の黒色化繊を直接かぶせて直がけ被覆栽培を行った。被覆は一番茶（4 月～5 月に栽培・収穫される茶）の時期に 30 日間、さらに二番茶（6 月～8 月に栽培・収穫される茶）の時期に 20 日間行った。被覆期間が終って新芽を収穫した後に、樹冠面に露出している葉を古葉としてサンプルに用いた。また対照として一番茶、二番茶とも被覆をかけずに栽培（露天栽培）したチャを用いた。被覆解除直前から解除後 2 週間にわたりクロロフィル（Chl）蛍光を測定し、光化学系 II 活性の指標である F_v/F_m 値の変動を調査した。その結果、F_v/F_m 値は一番茶での被覆解除後 3 日目まで低下した後、2 週間で回復し、以前の新芽での結果と同様の傾向が見られた。被覆解除直前の F_v/F_m 値は、新芽では対照に比べて高かったが、古葉では被覆の影響が見られなかった。また Chl 含量は、新芽と同様、古葉においても、被覆栽培することで高くなった。さらに弱光／強光応答の指標である Chl a/b 比は、新芽と同様、古葉においても被覆したチャでは低く、被覆解除後 2 週間で対照と同程度まで上昇した。また露天栽培したチャの古葉の Chl a/b 比は、新芽を収穫した後 1 週間にわたって上昇し、新芽とは異なる変動を示した。以上の結果から、被覆栽培したチャの古葉では、被覆解除することで照射される光に対して、新芽と同様の応答が観察されることがわかった。一方で露天栽培したチャでは古葉と新芽でやや異なる応答が見られた。露天栽培におけるこの差は、新芽の収穫後に古葉が樹冠面に露出して強光照射を受けることを反映していると考えられる。

tea, stress response, high light

発表責任者：森田　重人（s_morita@kpu.ac.jp）

講演番号：3A29a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟北 A29 会場

Stress induction of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in tomato plants: An attempt to mitigate using mannitol and catechin

○Wahdatullah KHPALWAK[1,2], Hiroshi SAKUGAWA[1] ([1]Dept. of Environmental Dynamics and Management, Grad. School of Biosphere Science, Hiroshima Univ., [2]Plant Protection Dept. Faculty of Agriculture, Nangarhar Univ.)

Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) are the nitrogen derivatives of PAHs which were shown to be more toxic than their parents. A study was conducted to characterize the toxic effects of 1-Nitropyrene (1NP) (oxidative stress inducer) on tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants, and to evaluate reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of mannitol (Mann) and catechin (CTH). Tomato seedlings were pot-grown in a greenhouse in Hiroshima University during May-August 2017. They were fumigated alone and in various combinations of 1NP, Mann and CTH for around 10 weeks (3 days a week) from mid-June to late August. Various physiological and biochemical parameters among others were analyzed using standard methods. The results revealed that 1NP induced oxidative stress to the plants through generation of ROS which ultimately had negative effects on certain measured parameters. The values of SPAD and chlorophyll fluorescence (ChlF) were significantly lowered 7 and 10 weeks after fumigation (WAF) compared to control, while this effect was not shown at 2 and 4 WAF. Chlorophyll a (Chl. a), total chlorophyll (Tot. Chl) and carotenoid (Carot) contents were significantly declined with 32.6%, 18.9% and 59.2%, respectively. Leaf water relations were significantly imbalanced, and catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes activities were significantly enhanced in comparison to control. Root fresh weight was significantly lowered while no significant effect was recorded in root dry weight as well as shoot fresh and dry weights. In one hand, the negative effects of 1NP was not shown in all the measurements while Mann was combined, and was not significantly different from control throughout the results which thus shows scavenging activity of Mann. On the other hand, CTH also scavenged the negative effects of 1NP on some measured parameters but was not as effective as Mann. From the findings, it was concluded that 1NP was responsible for generation of ROS which ultimately lead to the induction of oxidative stress in tomato plants. Mann effectively scavenged ROS-generated by 1NP, whereas CTH could only do so with lower efficiency.

1-Nitropyrene, Nitro-PAHs, Oxidative stress

発表責任者：Wahdatullah Khpalwak（khpalwak.uasd@gmail.com）

講演番号：3A29a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟北 A29 会場

Assessment of hybrid vigour using intraspecific Arabidopsis hybrids
○Thi Ngoc Quynh Le[1], Naoya Sugi[1], Miyako Kusano[1,2], Kazuki Saito[2,3], Hiroshi Shiba[1] ([1]Grad. sch. of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]RIKEN, CSRS, [3]Chiba Univ.)

[Introduction]

The superior hybrid performance over their parents is defined as heterosis or hybrid vigor. As the growing population, hybrid has contributed greatly to world-wide yield. Heterosis has been studied by many researcher in plant breeding and genetics field. Recently, changes in transcriptome or epigenetic factors (DNA methylation, small RNA) between F_1 hybrids and parents have been reported. However, knowledge of molecular mechanism underlying heterosis has been still fragmented. As the increase in biomass is characterized by multiple factors, it is conceivable that a variety of factors due to individual differences and growth environments might be the cause of unclarifying hybrid vigor mechanism. In this study, establishment of new cultivation system was attempted to minimize such environmental factors as much as possible. Then, to equalize growth stage of the plants, F_1 hybrids and their parents were checked the timing of germination and switched time points sowing. Final goal of this research is identify the important factors determining the phenotypic variation amongst Arabidopsis F_1 progenies by using gene functional analysis and metabolome analysis.

[Results]

A total of 200 *A. thaliana* accessions were used in this study. In selection process, late-flowering accessions were eliminated. Besides, the accessions with significant difference in seed size between two parents and their F_1 hybrids were continuously omitted due to affect seed germination time and seedling growth rates. Over 30 ecotypes were selected and generated F_1 hybrids which have been performing on the new cultivation system. Then, we divided two divergent groups of heterosis level. The strong heterosis of F_1 hybrids had 11.6 % to 32.9 % (P<0.01) increase over better parent value (BPV) in seedling biomass, whereas the weak vigor of hybrids ranged 1.8 % to 9.8 % (P<0.05) over BPV. In addition, preliminary metabolome analysis in one of the largest F_1 hybrids and their parents was already conducted and some candidate pathways which may be important for greater growth was estimated. In the future, hybrids showing different levels of heterosis will be checked in metabolite profiling and molecular analysis. Possible mechanism of gene and metabolic regulation arising from heterozygous parents will be discussed.

heterosis, hybrid, Arabidopsis

講演番号：3A29a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟北 A29 会場

シロイヌナズナ種内雑種における代謝物プロファイリング
Metabolite Profiling in Intraspecific Arabidopsis Hybrids
○杉 直也[1]、レ ティ ノ クィン[1]、草野 都[1,2]、斎藤 和季[2,3]、柴 博史[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]理研・CSRS、[3]千葉大・薬)
○Naoya Sugi[1], Thi Ngoc Quynh Le[1], Miyako Kusano[1,2], Kazuki Saito[2,3], Hiroshi Shiba[1] ([1]Univ. of Tsukuba., [2]RIKEN CSRS, [3]Chiba Univ.)

【目的】雑種強勢は、異なる種間あるいは種内系統間の交配で得られた F_1 雑種において、その両親と比較してバイオマスの増大、ストレス耐性向上等により旺盛な生育を示す現象である。当該現象は農業分野において生産性の増加に大きく貢献している重要な現象であることから盛んに研究されているが、過去の育種学・遺伝学的アプローチではその全容を明らかにすることは出来ていない。また近年、F_1 雑種における様々な遺伝子発現の変化やエピジェネティックな遺伝子発現制御因子の変化が報告されているものの、そのメカニズムの全容解明には至っていない。そこで、発現活性・酵素活性等を反映し、表現型に直結する代謝物レベルにおける変化を捉え、雑種強勢メカニズムに対する新規知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】雑種強勢で見られるバイオマスの増大は多数の因子が複合的に作用する量的形質であり、栽培時の様々な環境要因から多大な影響を受けると考えられる。そこで栽培環境要因のばらつきを極力排除し、均一化された新規バイオマス測定系の確立を進めた。上記栽培条件で両親系統及びその F_1 雑種を生育したところ、両親系統に比べて生重量比で 20%程度のバイオマス増大が見出された。それらをサンプルとして予備的ながらメタボローム解析を行ったところ 229 種類の代謝産物が検出され、中には F_1 雑種において有意な増減を示した代謝物も存在した。それらの中には雑種強勢形質として知られるバイオマスの増大やストレス耐性向上に対する直接的な関与が示唆される代謝物が存在したため、現在、F_1 雑種で変化した代謝物の表現型への関与について検証すると共に、メタボローム解析については再現性の確認を進めている。本発表では、最終的に得られた代謝物データをもとにそれらの代謝物変化の原因として考えうる代謝関連遺伝子群の活性に変化が生じているかを検討し、これらの結果を合わせて雑種強勢の制御メカニズムについて議論したい。

Heterosis, metabolomics, regulation of gene function

講演番号：3A29a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟北 A29 会場

アスコルビン酸生合成主要因子 *VTC2* の発現を調節する転写因子の機能解析
Analysis of transcription factors involved in regulating the expression of *VTC2*, which is master regulator in ascorbate biosynthesis
○崎下 絢子[1]、中川 泰斗[2]、田部 記章[2]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ)
○Ayako Sakishita[1], Taito Nakagawa[2], Noriaki Tanabe[2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ.)

【目的】アスコルビン酸(AsA)は植物細胞内に高濃度存在し、生理応答調節の根幹を担う水溶性の多機能性化合物である。AsA の生合成は D-フルクトース 6-リン酸を初発物質とした D-マンノース/L-ガラクトース経路を主経路としており、明期においてその合成量が増加する。この経路に関与する遺伝子のうち、*GDP-L-galactose phosphorylase*(*VTC2*)の光応答は最も顕著であり、AsA 生合成の明暗制御の主要因子と考えられている。最近、*VTC2* の 5’UTR 領域から翻訳される短鎖ペプチドが AsA レベルを負に制御することが明らかにされたが、*VTC2* 遺伝子の発現制御機構については未だ不明な点が多く残されている。これまでに、*VTC2* のプロモーター領域を解析した結果、*VTC2* の転写開始点上流-70 から-118 bp の配列が光応答性に必須なシス配列であることを見出した。さらに、酵母 one-hybrid 法により、このシス配列に特異的に結合する 3 つの転写因子(*VTC2* cis-binding protein: VCP)を同定した。また、レポーターアッセイによって、VCP1 は転写促進因子、VCP2、VCP3 は転写抑制因子である可能性が示唆された。本研究では、*VTC2* プロモーター領域を介した細胞内 AsA レベル制御機構における VCPs の機能解析を行った。

【方法と結果】T2 世代の *VCP1* 過剰発現株の葉における AsA 量を定量した。2 週齢の野生株と *VCP1* 過剰発現株における AsA 量は、野生株と比較して *VCP1* 過剰発現株で増加する傾向がみられた。一方で、T-DNA 挿入によって *VCP1* 遺伝子が欠損した *vcp1* 株と野生株との間では、AsA 量に差はみられなかった。このことから、*VTC2* の遺伝子発現を正に制御する因子は *VCP1* 単独ではなく、他の因子が関与することが示唆された。一方で、T-DNA 挿入および CRISPR/CAS9 システムを用いた *VCP2* 遺伝子破壊株の作出を試みたが、いずれの方法においてもホモ個体は単離できなかった。これらの結果は *VCP2* の遺伝子破壊は胚性致死であることを示唆していた。転写抑制因子である VCP2 は DNA 結合領域を持たず、他の因子との相互作用を介して転写を制御することが知られている。そこで、酵母 two-hybrid 法により VCP2 の相互作用因子を探索した結果、VCP2 と同じファミリーに含まれる転写因子を複数同定した。これらの転写因子ファミリーには 32 の遺伝子が含まれ、保存性の高いドメインが存在する。このことから、酵母 two-hybrid 法により単離した遺伝子と VCP2 の結合に特異性があるのかを明らかにするために、α-ガラクトシダーゼアッセイによる VCP2 との結合強度解析を試みている。

ascorbate, *GDP-L-galactose phosphorylase*, transcription factor

講演番号：3A29a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟北 A29 会場

ヒメツリガネゴケの PAS-HK は茎葉体形成を抑制する

PAS-containing histidine kinases regulate gametophore formation in the moss Physcomitrella patens.

○龍 昌志[1]、山篠 貴史[2]、野本 友司[2]、後藤 友規[1]、一瀬 瑞穂[3,4]、佐藤 健介[5]、杉田 護[3]、青木 摂之[1,5]（[1]名大院情科、[2]名大院生命農、[3]名大遺伝子、[4]名大 ITbM、[5]名大院情報）
○Masashi RYO[1], Takafumi YAMASHINO[2], Yuji NOMOTO[2], Yuki GOTO[1], Mizuho ICHINOSE[3,4], Kensuke SATO[5], Mamoru SUGITA[3], Setsuyuki AOKI[1,5] ([1]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr., Nagoya Univ., [3]Ctr. Gene Res., Nagoya Univ., [4]ITbM., Nagoya Univ., [5]Grad. Sch. Info., Nagoya Univ.)

二成分制御系は、原核生物や一部の真核生物に広く保存された環境応答・細胞内情報のシグナル伝達機構である。この機構において、シグナルはリン酸基の転移を介してヒスチジンキナーゼ（HK）からレスポンスレギュレーターに伝達される。コケ植物ヒメツリガネゴケは植物で最も多様な HK 遺伝子群をもつが、それらの機能はよくわかっていない。本研究では、2 つの PAS（Period-Arnt-Sim）ドメインをもつ HK 遺伝子を 2 つ（*PAS-Histidine Kinase*; *PHK1* と *PHK2* とする）クローニングし、その機能解析を行った。

はじめに、PHK1 と PHK2 のアミノ酸配列を用いて、分子系統解析を行った。PHK のホモログは、コケ植物とシダ植物に見られたが、被子植物と裸子植物には存在しなかった。続いて、PAS タンパク質の配列を用いて、PHK1 と PHK2 の進化的位置づけを試みた。その結果、PHK ホモログの PAS ドメインは、植物が持つ PAS ドメインではなく、原核生物の機能未知 PAS ドメインと高い相同性を示した。したがって、PHK は基部陸上植物に特徴的な因子であると考えられる。

相同組換えにより、PHK1 と PHK2 それぞれの単独／二重変異株を作出した。変異株を明暗条件下で生育させた結果、茎葉体発生の早期化が観察された。さらに、変異株のカウロネマ細胞の分岐形成率の増加が観察された。カウロネマ細胞の分岐は、青色光と赤色光に誘導されることが知られている。野生株では赤色光の強さに応じて分岐率が調整されたが、変異株では赤色光強度非依存的にカウロネマ細胞の分岐が促進された。この結果から、PHK1 と PHK2 は赤色光のシグナル伝達機構に関与し、カウロネマ細胞の分岐を制御することで、茎葉体の発生のタイミングを決定していることが示唆された。

PHK1 と PHK2 が酸素シグナルの受容・伝達に関係するかどうかを調べるため、野生株と変異株を嫌気条件で培養した。嫌気条件下では野生株の生育が著しく阻害されたが、その一方で、変異株はフェルト状のコロニーを形成し、十分に生育した。フェルト状のコロニーは、ミトコンドリアの RNA 編集因子を欠損させた株でも見られる。そのため、PHK1 らは呼吸の電子伝達系に作用すると考えられた。

PHK1 と PHK2 は赤色光の受容や呼吸活性の状態に依存して、ヒメツリガネゴケの発生を抑制することが明らかになった。PAS を持つ HK は基部陸上植物に固有の因子であり、植物が陸上化するにあたり、重要な役割を果たした可能性がある。

本発表では、最新の結果とともに、これらの成果を報告する。

Physcomitrella patens, histidine kinase, gametophore formation

講演番号：3A29a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟北 A29 会場

サツマイモ不定根原基特異的発現を示す転写抑制因子 IbPLATZ の機能解析

Functional analysis of transcriptional repressor Ib PLATZ from sweet potato

○瀬古 友梨恵[1]、村上 聡[2]、田部 記章[2,3]、田茂井 政宏[1,2,3]、重岡 成[1,2,3] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]CREST・JST)
○ Yurie SEKO[1], Satoshi MURAKAMI[2], Noriaki TANABE[2,3], Masahiro TAMOI[1,2,3], Shigeru SHIGEOKA[1,2,3] ([1]Kinki Univ. Grad., [2]Kinki Univ., [3]CREST・JST)

【目的】サツマイモの塊根は、不定根が特定の時期に肥大したデンプン貯蔵組織である。不定根原基は茎に存在する節から形成された後に、太さを増し塊根へと生長する。また、比較的初期に形成された不定根原基のみが塊根へと成長することから、塊根形成に重要な因子は不定根原基の形成初期に機能していることを示唆する。これまでに、サツマイモ不定根原基形成時に特異的に発現している遺伝子として、機能未知転写因子をコードする *Plant AT-rich sequence zinc-binding protein* (*IbPLATZ*) を見出した。植物体の生育に対する *IbPLATZ* 遺伝子発現の影響を解析するためにシロイヌナズナに恒常的に発現させたところ、*IbPLATZ* 恒常的発現株は正常な成長が阻害された。これらの結果は、IbPLATZ は植物の形態形成を制御する転写因子であることを示唆していた。PLATZ 遺伝子はエンドウマメから単離されているが、その機能についてはほとんど明らかにされていない。そこで、IbPLATZ の転写因子としての機能解析を試みた。
【方法・結果】シロイヌナズナにおける *IbPLATZ* の恒常的発現が生育を阻害したことは、IbPLATZ が転写抑制因子であることを示唆していた。そこで、IbPLATZ の C 末端側に転写抑制ドメインである SRDX を融合させたタンパク質、もしくは転写活性化ドメインである VP16 を融合させたタンパク質を恒常的に発現させたシロイヌナズナを作出した（それぞれ *p35S::IbPLATZ-SRDX* および *p35S::IbPLATZ-VP16*）。その結果、*p35S::IbPLATZ-SRDX* 株は IbPLATZ 恒常的発現株と同様に矮性を示したが、*p35S::IbPLATZ-VP16* 株は野生株と同様の表現型を示した。これらの結果は、IbPLATZ が転写抑制因子として機能することを示していた。次に、IbPLATZ が関与する転写抑制機構を明らかにするために、酵母 two-hybrid 法を用いて IbPLATZ の相互作用因子の同定を試みた。その結果、栄養要求性培地で生育した 4 つの陽性クローンを得た。これらの中には、phosphopyruvate hydratase をコードする遺伝子が含まれていた。この遺伝子からは、選択的翻訳機構により転写補因子が生成されることが知られている。現在、IbPLATZ の転写抑制機構における転写補因子の機能解析を試みている。一方、シロイヌナズナゲノムにも 12 種類の PLATZ ドメインを有する遺伝子がコードされている。12 種類の組織特異的な発現を解析した結果、いくつかは *IbPLATZ* と同様に根特異的に発現していた。現在、これら 12 種類の恒常的発現株および遺伝子破壊株を作出し、個々の機能について解析している。

plant, transcriptional repressor, PLATZ

講演番号：3A29a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟北 A29 会場

ストレスに応答した青シソ二次代謝関連遺伝子の発現制御
Stress-responsive gene expression for secondary metabolisms in *Perilla frutescens*
平安山 昌史[1]、井口 広也[1]、加川 夏子[2]、○華岡 光正[1] ([1]千葉大院・園芸、[2]千葉大・環境健康フィールド科学セ)
Masahumi HENZAN[1], Hiroya IGUCHI[1], Natsuko KAGAWA[2], ○ Mitsumasa HANAOKA[1] ([1]Graduate School of Horticulture, Chiba University, [2]Center for Environment, Health and Field Sciences, Chiba University)

【背景と目的】
植物は、自身の生命活動を維持するために必要な物質を生成する一次代謝経路に加え、様々な二次代謝経路を有している。この二次代謝経路で産生される物質は、植物の自己防衛のためのストレス応答などに利用されている。本研究で用いた青シソ *Perilla frutescens* は生育や繁殖が容易であることから研究材料に適しており、また二次代謝産物としてロスマリン酸などに代表されるフェニルプロパノイドやフラボノイド・テルペノイド類を多く合成する植物種である。本研究では、青シソの葉における二次代謝産物の合成・蓄積量の増大を目指し、様々な環境ストレスに依存した二次代謝関連遺伝子の発現制御について研究を行った。

【方法と結果】
1 cm 四方に断片化することで傷害ストレスを与えた葉から Total RNA を抽出してノーザン解析を行った結果、傷害ストレス処理後 2～4 時間をピークとしてフェニルプロパノイド合成に関わる遺伝子である *HPRP* と *RAS* の発現量の増加が確認された。一方で、500 μmol photons・m^{-2}・s^{-1} の強光ストレスを付与しても両遺伝子の発現上昇は見られなかった。また、HPLC を用いた成分定量解析の結果、ストレスに応答した遺伝子発現量の変動はロスマリン酸などの二次代謝産物の含有量の変化に反映されていることが示された。以上の結果から、少なくとも傷害ストレスが青シソのフェニルプロパノイド合成の促進に関与することが示唆され、他の様々な環境ストレスと二次代謝関連遺伝子発現の関係についてもあわせて報告する。

Gene expression, Stress response, Secondary metabolism

発表責任者：華岡 光正（mhanaoka@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3A29a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟北 A29 会場

クルクリゴ属植物における次世代シーケンサーを用いたネオクリン類似遺伝子グループの発現解析
Expression analysis of neoculin-like gene groups in two *Curculigo* plants by using Next Generation Sequencer

○大久保 智史[1]、寺内 かえで[2]、山浦 高夫[1]、阿部 啓子[2]、朝倉 富子[2]([1]日本新薬(株)、[2]東大院農生科・応生化)
○Satoshi OKUBO[1], Kaede TERAUCHI[2], Takao YAMAURA[1], Keiko ABE[2], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Nippon Shinyaku Co., Ltd., [2]Univ Tokyo)

【背景･目的】熱帯植物クルクリゴ(*Curculigo latifolia*)の果実から得られる、酸味を甘味に変える味覚修飾タンパク質ネオクリンは、アミノ酸配列からマンノース結合レクチンに近い構造を持つことが明らかとなっている。このタンパク質がどのようなレクチンから変化したのかを探るために、クルクリゴおよび同属のオオキンバイザサ(*C. capitulata*)の果実で発現している遺伝子を次世代シーケンサー(NGS)を用いて網羅的に解析した。本研究では、この解析で見出されたネオクリンとそれに類似した遺伝子について報告する。
【方法･結果】クルクリゴとオオキンバイザサの果実から totalRNA を抽出し、Illumina HiSeq を用いて、Paired-End で読み取りを行った。トリミング後の sequence を Trinity により assemble を行い、contig を得た。また Trinity 同梱の RSEM を用いて各 contig の発現量を推定した。
トリミング後の read 数はクルクリゴで 44,396,896、オオキンバイザサで 43,863,440、contig 数は各々85,697、76,775 だった。得られた contig データセットに対して、ネオクリンの 2 つのサブユニット NAS、NBS をそれぞれ query として BLAST 検索を行ったところ、クルクリゴからは 19 の類似性の高い contig が見出され、内の 2 つは NAS、NBS であった。同様にオオキンバイザサからは 32 の contig が見出され、内 2 つは発現量は微量であるが NAS と NBS に極めて近かった。これらの内、発現量の比較的多いと考えられる FPKM 値 100 以上の contig はクルクリゴで 4 個、オオキンバイザサでは 6 個だった。これらクルクリゴの 4-contig およびオオキンバイザサの 6-contig と微量だが NAS に極めて近い 2-contig をネオクリン類としてアミノ酸翻訳し、さらに NCBI nr に登録のマンノース結合レクチンのアミノ酸配列も合わせた 32 個のアミノ酸配列に対して、ClustalX を用いて alignment と系統樹作成を行った。推定アミノ酸配列の内、オオキンバイザサに最も多量に含まれる contig はネオクリンに類似した配列(NBS とアミノ酸配列が 80.37%一致)である上に、マンノース結合ドメインである QxDxNxVxYx のアミノ酸配列を有し、レクチンとして機能していることが示唆された。また系統樹では、ネオクリン類は他のアミノ酸配列との一致度が低く、ほぼ独立した 2 つのグループを形成した。
これらの結果から，*Curculigo* 属にはオオキンバイザサに見出されたレクチンが含まれており、クルクリゴに存在するネオクリン(NAS、NBS)はそのレクチンが変異してできた可能性が示唆される。実際の転写物や他の *Curculigo* 属植物におけるレクチンの有無から、検証を予定している。

taste modification, RNA-seq, mannose binding lectin

講演番号：3A29a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟北 A29 会場

ユーグレナにおける Nuxix hydrolase ファミリーの機能解析
Functional analysis of *Euglena* Nudix hydrolase
鈴置 友伽[1]、瀧下 龍之助[1]、小川 貴央[2]、石川 孝博[2]、○吉村 和也[1]([1]中部大応生食栄、[2]島根大生資科生命工)
Yuka SUZUOKI[1], Ryunosuke TAKISHITA[1], Takahisa OGAWA[2], Takahiro ISHIKAWA[2], ○Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

Nudix hydrolase (NUDX) は古細菌から動植物に至るあらゆる生物に存在する巨大な酵素ファミリーである。近年、植物における本酵素は突然変異の原因となる酸化ヌクレオチドの浄化や、補酵素として必須の NAD(P)H、CoA および FAD などの細胞内レベル制御を介して、種々の代謝系の制御や環境ストレス応答に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、真核藻類のユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、他の生物とは類似しないユニークな代謝系や優れた環境適応能力を有している。そこで本研究では、ユーグレナにおける NUDX の同定および機能解析を試みた。

EST データベース情報を基にユーグレナにおける NUDX の発現解析を行った結果、細胞質（10 個）、ミトコンドリア（1 個）および細胞外（1 個）局在型の NUDX の発現が確認された。そこで、それらの大腸菌を用いた組換えタンパク質の生成を行った。その結果、12 種類のユーグレナ NUDX のうち、細胞質局在型の 7 種類（Eu.33104, Eu.48456, Eu.NUDX, Eu.51053, Eu.53262, Eu.52696, Eu.109572）の組換えタンパク質の発現および精製に成功した。それらの基質特異性を解析した結果、Eu.NUDX は NADH、ジアデノシンポリリン酸、および CoA に対して、Eu.48456 は dTTP、dATP、dGTP、および 8-oxo-dGTP に対して、Eu.52696 は唯一 dGTP にのみ加水分解活性を示した。一方、Eu.33104, Eu.51053, Eu.53262, Eu.109572 はいずれの基質に対しても活性を示さなかった。Eu.NUDX は Mg^{2+}を捕因子としたとき最も活性が高く、Mn^{2+}では約 80%、Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}では 35%以下の活性を示した。本酵素の NADH に対する最大活性は 5.03 μmol/min/mg protein、K_m値は 26.4 μM、ADP-ribose に対する最大活性は 2.69 μmol/min/mg protein、K_m値は 1568.3 μM であった。RNAi 法による発現抑制の結果、いずれの NUDX 抑制株においても独立および従属栄養条件下での生育に顕著な差は観察されなかった。このことから、少なくとも、これら NUDX は通常条件下でのユーグレナの生育に必須ではないと考えられた。今後、各 NUDX 抑制株の種々のストレスに対する応答や複数の NUDX の同時抑制による影響を検討する必要がある。

Nudix hydrolase, *Euglena*, NUDX

発表責任者：吉村和也（k-yosi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3A29a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟北 A29 会場

Involvement of abiotic stress-related bZIP transcription factors on the regulation mechanism of branched chain amino transferase in Oryza sativa

○Tun Yee Yee, Takumi Matsuo, Takashi Yuasa (Miyazaki University)

Several biotic and abiotic stresses impair the crop in correlation with dramatic changes in primary plant metabolisms resulting in decline photosynthesis, protein and amino acid degradation, or hydrolysis of polysaccharides. The basic leucine zipper (bZIP) genes encode a superfamily of transcription factors that mediate plant stress responses. The induction of transcription factors possibly regulating the expression profile of a specific group of bZIPs , amino acid catabolizing *(Bcat)* genes, and autophagy related genes *(Atg)* in rice plant were examined under shading induced low energy stress in the review. The induction profiles of bZIP 53 and *Bcat* genes were consistently down-regulated, nevertheless bZIP 52, bZIP 12 and autophagy related genes were induced in various shade- induced stress conditions. These result indicate that shading stress decrease the expression of bZIP53 possibly induce the subsidence transcriptional induction of *Bcat* genes under shade-induced stress. Furthermore, the increased expressions of bZIP52 and bZIP12 lead to the induction of autophagy genes. Based on these results, it suggests that the decrease of BCAA synthesis by reduction of Bcat gene expression leads to autophagy related degradation of photosynthesis proteins in rice via alternative pathway of senescence process under shading stress.

bZIP gene, branched chained amino transferase, abiotic stress and autophagy

発表責任者：Takashi Yuasa（yuasa@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3A29p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟北 A29 会場

Combi-OGAB 法を利用した最適コドンの探索
Exploring optimal codons by Combi-OGAB method
○寺井 悟朗[1]、高橋 俊介[2]、中村 朋美[2]、柘植 謙爾[2]、石井 純[2]、浅井 潔[1] ([1]東京大学、[2]神戸大学)
○Goro TERAI[1], Shunsuke TAKAHASHI[2], Tomomi NAKAMURA[2], Kenji TSUGE[2], Jun ISHII[2], Kiyoshi ASAI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kobe Univ.)

目的タンパク質の生産量を最大化する技術を開発することは、微生物などを利用した有用タンパク質の生産において重要な課題である。タンパク質の発現量は、タンパクコード領域の塩基配列（コドン配列）により変化することが知られている。しかしながら、その分子メカニズムは不明な点が多く、最適なコドン配列をデザインするための決定的な方法は存在しない。一般に、目的タンパク質のコドン配列をデザインする際には、Codon Adaptation Index（CAI）などの指標が用いられるが、CAI によるコドン配列のデザインは必ずしも発現量の上昇につながらないことが報告されている。

我々は実験と情報解析を組み合わせて、目的タンパク質のコドン配列を最適化する技術の開発を行っている。本技術では、枯草菌を利用した DNA 集積法である OGAB 法を応用し、同じアミノ酸をコードしつつ様々なコドン配列をもつプラスミド DNA を多数生成する（Combi-OGAB 法）。生成したプラスミド DNA のコドン配列とタンパク質発現量の関係に基づき、次に調査すべきコドン配列をデザインする。具体的な手順は下記のようなものである。

１） Combi-OGAB 法により多様なコドン配列を持つプラスミド DNA を多数作成する。
２） これを宿主となる微生物に導入し、各宿主細胞から得られるタンパク質の発現量の測定と、コドン配列のシーケンシングを行う。
３） 発現量と配列データを情報解析し、新たなに探索すべきコドン配列群をデザインする。
４） デザイン結果に基づき１）を行う。

この１）－４）のサイクルを繰り返すことで、最適なコドンを探索する。本技術を構築するため、緑色蛍光タンパク質（Green fluorescent protein: GFP）を用いた実証研究を行っている。同じ GFP をコードするが様々なコドン配列を持つプラスミド DNA を Combi-OGAB 法を用いて作成し、これを出芽酵母に導入した。得られた出芽酵母の集団から 12 個の細胞を単離し、GFP の発現量の測定と、コドン配列のシーケンシングを行った。12 種類のうち 7 種類の出芽酵母では、GFP をコードするプラスミド DNA を持つにもかかわらず、GFP を全く発現していなかった。残りの 5 種類は GFP を発現していたが、GFP の蛍光強度に 2 倍程度のばらつきがあった。GFP の発現が見られない出芽酵母は、コドン配列の GC 含量が高く、アルギニンのレアコドンである GGG の出現頻度が高いという傾向が見られた。また、GFP の発現が見られる出芽酵母のコドン配列はセリンをコードする UCU コドンが多いなどの傾向が見られた。

Codon, Gene expression, Bioinformatics

発表責任者：寺井　悟朗（terai@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A29p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟北 A29 会場

細胞内局在を改変したキュウリモザイクウイルス 2b タンパク質が RNA サイレンシングに与える影響
Modification of intracellular localization of cucumber mosaic virus 2b protein and its effects on the suppressor activity of plant RNA silencing

○下川 麻優子、児玉 浩明（千葉大院・園芸）
○Mayuko SHIMOKAWA, Hiroaki KODAMA (Chiba Univ.)

RNA サイレンシングとは small RNA を介した遺伝子発現抑制機構で、植物においてはウイルス防御機構としての役割を持つ。一方でウイルスは自身の感染・増殖のために宿主植物の RNA サイレンシングを阻害する VSRs（viral suppressors of RNA silencing）というタンパク質をコードしており、*Cucumber mosaic virus* がコードする 2b タンパク質は RNA サイレンシング因子と相互作用することで宿主の RNA サイレンシングを阻害する。2b タンパク質は 2 つの NLS（nuclear localization signal; 核移行シグナル）を持っているために核に局在するが、その重要性についてはまだ不明な点が多い。また、AGO1（Argonaute 1）や、SGS3（suppressor of gene silencing 3）、RDR6（RNA-dependent RNA polymerase 6）といったサイレンシンング経路の主要な因子はサイトゾルに局在しており、サイトゾルに残存する 2b タンパク質が VSR として重要な役割を持つことが報告されている。

本研究では 2b 遺伝子にさらに NLS 配列および NES（nuclear export signal; 核外移行シグナル）を付加した遺伝子発現コンストラクトを作製し、*Nicotiana tabacum* へ遺伝子導入を行った。2b-NLS 発現株および 2b-NES 発現株と当研究室で作製された IR-PTGS（inverted-repeat post-transcriptional gene silencing）株、S-PTGS（sense-transgene induced post-transcriptional gene silencing）株とを交配させ、サイレンシング抑制作用について調べた。前述の 2b-NLS 遺伝子、2b-NES 遺伝子発現コンストラクトを GFP 融合タンパク質として各シグナル配列機能を確認したところ、GFP-2b-NLS ではサイトゾルにおける蛍光が消失し、核において極めて強い蛍光が観察され、核に強く局在することがわかった。一方で GFP-2b-NES では、核小体の蛍光が消失し、サイトゾル全体に蛍光が観察され、多くはサイトゾルに分布することがわかった。なお、2b-NLS 遺伝子、2b-NES 遺伝子の導入による植物の形態的特徴への影響はみられなかった。2b-NLS 株・2b-NES 株と IR-PTGS 株および S-PTGS 株との交配株での RNA サイレンシング抑制作用を調べたところ、いずれの交配株においても IR-PTGS は抑制しないが S-PTGS は抑制することがわかった。

Cucumber mosaic virus, 2b protein, RNA silencing

講演番号：3A29p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟北 A29 会場

超低温保存後の交雑ポプラ茎頂の個体再生率向上への試み
Improvement of regrowth rate of shoot tips of hybrid aspen after cryopreservation by vitrification method

○川村 浩平[1]、嘉見 大助[2]、鈴木 伸吾[1]、田中 大介[3]、遠藤 圭太[4]、大槻 祐香子[1]、藤川 清三[1]、山岸 祐介[1]、荒川 圭太[1]([1]北大農、[2]農研機構北農研セ、[3]基生研 IBBP セ、[4]森林総研林育セ)
○Kohei KAWAMURA[1], Daisuke KAMI[2], Shingo SUZUKI[1], Daisuke TANAKA[3], Keita ENDOH[4], Yukako OTSUKI[1], Seizo FUJIKAWA[1], Yusuke YAMAGISHI[1], Keita ARAKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NARO HARC, [3]NIBB IBBP, [4]Forest Tree Breeding Center)

【緒言】
植物の遺伝資源保存の方法として、圃場保存、種子保存、培養保存などが代表的なものとして挙げられるが、それぞれに長所と短所がある。そのため植物種によっては長期間安定的かつ簡便な保存方法の開発が求められている。そこで、樹木遺伝資源の保存のため、液体窒素を用いて超低温下で試料を保存する超低温保存法を適用することにした。本研究では、形質転換が可能なモデル樹木の一種として知られている交雑ポプラの野生株とその形質転換株の茎頂を用いて最適な保存条件の検討を行った。

【材料および方法】
材料として、交雑ポプラ（*Populus tremula* × *P. alba*）の野生株と、小胞体（ER）局在性緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する形質転換株を用いた。無菌培養した個体から茎頂を切り出して前培養を行い、ローディング液による前処理を施した後、ガラス化液（PVS2：30%グリセロール、15%エチレングリコール、15%ジメチルスルホキシド、0.4 M スクロース、1/2 濃度の Murashige and Skoog 液体培地）で処理してから液体窒素に浸漬して超低温保存を行った。液体窒素中で 1 時間保存した茎頂を急速昇温しガラス化液を取り除いた後、再生培地に置床して培養開始後 3 週間時点での生存率を調べた。また、培養開始後 6 週間時点で伸長して発根に至ったものの割合を再生率として評価した。

【結果および考察】
これまでの研究では、0℃に維持した PVS2 液で 90 分間のガラス化液処理を行うことで、保存後の茎頂の生存率が約 80%に達したものの、それらの再生率は約 20%にとどまっていた。そこで本研究では、再生培地に植物ホルモンを添加することによる再生率の向上を目指した。予備実験により、培地に 1.0 μM のゼアチンを添加することでシュート誘導が促されることが示唆されたため、同様の培地に超低温保存後の茎頂を置床した結果、再生率は約 60%に向上した。また、発根誘導を目的として 1.0 μM のインドール酪酸を再生培地に添加したところ、数多くの茎頂が発根した。これにより、超低温保存後の茎頂の再生培地に植物ホルモンを添加することで、供試した交雑ポプラの野生株と形質転換株のいずれにおいても比較的効率よく個体再生が可能となることがわかった。

cryopreservation, hybrid aspen, vitrification

発表責任者：荒川圭太（keita-ar@for.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A29p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟北 A29 会場

根こぶ病菌の試験管内感染実験系の構築にむけた園芸種ハクサイのカルス化とその発根の検討

Establishment of a callus line for stable proliferation and rooting regulation using Chinese cabbage.

○岡田 香保[1]、早崎 君江[1]、櫛谷 綾香[2]、東 慶直[1,2] ([1]近畿大学大学院生物理工学研究科、[2]近畿大学生物理工学部)
○Kaho OKADA[1], Kimie HAYASAKI[1], Ayaka KUSHITANI[2], Yoshinao AZUMA[1,2] ([1]Graduate School of BOST, Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

根こぶ病はアブラナ科野菜に特異的に感染する難防除性の土壌伝染病害であり、世界各地で甚大な農作物被害を生み出している。アブラナ科野菜の根に根こぶ病の原因である根こぶ病菌が感染すると、菌の細胞内増殖に従い罹患植物の根にコブが形成される。このコブが維管束を圧迫することで、植物体は土壌から養分や水分を吸収できなくなり生育が著しく遅延する。根こぶ病菌 *Plasmodiophora brassicae* はアブラナ科野菜の根にのみ感染する偏性細胞内寄生性の原虫であり、独立に培養することが出来ない。そのため基礎的な感染機構の研究は他の病原菌と比較して遅れている。本研究では、根こぶ病菌の感染メカニズムを明らかにするための基盤技術となる試験管内感染実験系の構築を目指して、ハクサイ由来のカルスの作成と発根方法の開発を行った。

まず、アブラナ科野菜の感染モデル宿主として易感染性のミニハクサイを用いて、野菜茶業研究所から分与された根こぶ菌液から感染性の高い根こぶ菌を限界希釈法によりクローン化した。カルスの樹立を目的として、発芽二日目のミニハクサイを葉、胚軸、根に分け、園芸ハクサイのカルス樹立に使われていたホルモン濃度を含む培地で培養したところ、胚軸からカルスが最も効率的に誘導された。さらに、胚軸からのカルス誘導におけるホルモン濃度の最適化を行ったところ、2.6 μM ナフタレン酢酸(NAA)と 8.8 μM ベンジルアデニン(BA)の添加が低濃度側の最適濃度であることが明らかになった。樹立直後のカルスからの根の誘導を試みたところ、21.4 μM NAA と 4.4 μM BA 含む培地で二週間培養した後、NAA を含まず、4.4 μM BA 含む培地において一週間の培養において効率的に発根がみられた。初期的な試験管内感染実験系として、クローン化された根こぶ病菌を用いてカルスからの根に感染実験を行ったところ、大きなコブの発生はみられなかったが、PCR によって感染は確認された。しかし、ほとんどのカルスは 1 ヶ月程度の培養で褐変し、増殖を停止する。そこで、カルス培養に適した範囲での植物ホルモンの低濃度培養と高濃度培養を交互に繰り返したところ、長期に培養可能なカルス系統を 2 株(K23 及び AYAKA-P)樹立することに成功した。一般的に長期培養カルスは分化能を失っているとされている。実際に様々な植物ホルモン濃度の組み合わせを試みたが、発根は全く観察されなかった。しかし、カルス K23 株にある刺激を加えることにより、発根誘導が可能なライン K23-E の獲得に成功した。現在はこの根を用いて感染実験の確立を進める。本学会では、カルスの樹立について詳細なデータを示すと共に、初期的な試験管内感染実験系について発表を行う。

Plant disease, Plant pathogen, parasitic protozoan

講演番号：3A29p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟北 A29 会場

籾殻シリカ形成の分子機構解明に向けたタンパク質の探索
Silica biomineralization of rice husk：What organic matrices are associated with silica formation?
○安孫子 澪、後藤 千佳、尾崎 紀昭（秋県大生資科）
○Rei ABIKO, Chika GOTO, Noriaki OZAKI (Akita prefect. Univ.)

【背景・目的】イネ科植物は、ケイ酸を多量に吸収することが知られている。その吸収機構は既に明らかになっており、根のトランスポーターからケイ酸を取り込み、導管を通して地上部に輸送する。輸送されたケイ酸は、籾殻や葉身の細胞の形状に依存した非晶質シリカとなり沈着される。形成されたシリカは植物体表面を強固にすることから、病害虫耐性および受光態勢の向上に寄与すると考えられているが、その形成機構については明らかになっていない。一方で、イネ科植物と同様に体内でシリカ形成を行うことが知られているケイ藻、海綿動物およびある種の細菌などにおいては、シリカ形成を促進する機能を持つ有機物（主にタンパク質）をシリカ内部に含んでいることが明らかになっている。したがって、イネのシリカ形成においても制御因子として機能するタンパク質が存在すると推測し、分子機構解明を目的として実験を行った。本研究では、イネ植物体中で最もケイ酸含量が多い籾殻を用いて、シリカ形成に関与するタンパク質の探索と同定を試みた。
【方法】籾殻の表層は、主にクチクラ層とシリカ層の 2 つから構成されている。初めに、上層のクチクラ層から下層のシリカ層表面にかけて存在するタンパク質を抽出するため、乾燥した籾殻を界面活性剤および還元剤を含む溶出バッファーに浸漬した。バッファーによるタンパク質溶出後は上清と残渣とを分け、上清については限外濾過によってタンパク質を濃縮した（洗浄画分）。続いて、溶出バッファー除去後の残渣を 4 M フッ化水素溶液に浸漬してシリカを十分に溶解した。反応後のフッ化水素溶液については透析・凍結乾燥を行うことによってタンパク質を回収し、SDS-PAGE 試料調製用のバッファーを添加してフッ化水素可溶性画分とした。得られた各画分を SDS-PAGE に供し、含有するタンパク質を分析した。各画分中の主要なバンドとして検出されたタンパク質については LC-MS/MS 解析によって同定を試みた。
【結果・考察】洗浄画分の SDS-PAGE 分析の結果、15, 25, 30 kDa 付近にバンドが検出された。これらのタンパク質はシリカ層よりも上層（クチクラ層）から得られたものと考えられるが、シリカの表面に付着していた可能性もある。一方、フッ化水素可溶性画分の SDS-PAGE 分析の結果においては、洗浄画分に見られるようなタンパク質のバンドは確認できず、120 kDa 付近のバンドのみが検出された。このタンパク質はフッ化水素によるシリカの溶解によって初めて検出されたものであることから、シリカ層の内部に含まれていることが示唆された。続いて、洗浄画分に含まれる最も主要な成分 25 kDa タンパク質について LC-MS/MS 解析による同定を行った結果、候補としてソーマチン様タンパク質スーパーファミリーに属する P21 タンパク質が高いスコアで選出された。したがって、籾殻表面組織においては感染特異的（PR）タンパク質が常在していることが示唆される。現在はシリカ内部に含まれると考えられる 120 kDa タンパク質についての LC-MS/MS 解析を進めており、主要成分の同定後は、候補タンパク質それぞれについてケイ酸重合活性測定などの機能解析を行うことでシリカ形成を促進する成分が存在するかどうか検討する。また、PR タンパク質の発現とシリカ形成との相関についても分析を進める予定である。

biomineralization, protein, rice husk

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3A29p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟北 A29 会場

インドール３酢酸の海藻カロテノイドへの影響

The effects of indole-3-acetic acid on algal carotenoids

○垣田 浩孝[1]、小比賀 秀樹[2] ([1]日大文理、[2]産総研健康工学)
○Hirotaka Kakita[1], Hideki Obika[2] ([1]Nihon Univ, [2]AIST Shikoku)

【諸言】水圏の中では海藻のいくつかの種はその付着微生物と相互作用しながら生育しているといわれている。ある種の海藻が出す排出物を海藻付着微生物が増殖に利用し、海藻付着微生物が産生する有機物質、植物ホルモンやビタミンを海藻が栄養源として吸収して増殖していることを示唆する報告もある。すでに褐藻類や緑藻類海藻において、無菌海水中での連続培養による海藻付着微生物叢が変化することが報告されている。近年演者らは紅藻類オゴノリ科海藻を無菌海水中で連続培養すると、海藻付着微生物叢が変化することを明らかにした。無菌海水中での連続培養においては海藻分泌成分を利用できる微生物が最も優勢になり、成長阻害された微生物が消失すると考えられている。
無菌海水中での連続培養により、紅藻類オゴノリ科海藻の優勢種となったのは、いずれもフラボバクテリアーサイトファーガであった。これらの微生物は黄色やオレンジ色の色を持ち、インドール生産することが特徴である。そこで本研究では、海藻付着微生物が産生すると考えられるインドール３酢酸（ＩＡＡ）がオゴノリ科海藻の成長及び成分に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】濾過海水を滅菌し、あらかじめ滅菌した補助栄養塩を添加して海水培地を調製した。ＩＡＡ含有海水培地の濃度は０ｍｇ／Ｌから２．５ｍｇ／Ｌで設定した。２００ｍＬ海水培地が入った三角フラスコにオゴノリ科海藻を入れ１８℃、６０μｍｏｌ／ｍ２ｓの条件で振とう培養（１００ｒｐｍ）を行った。日長時間は明期１４時間－暗期１０時間で行った。海藻中のカロテノイドとしてβカロテンを比較した。海藻抽出液を逆相ＨＰＬＣを用いて分析し、和光純薬製標準βカロテンを標準標品としてβカロテン濃度を定量した。各海水での海藻湿重量増加も測定した。
【結果】ＩＡＡ未添加海水に比べて、ＩＡＡ添加海水で培養したオゴノリ科海藻の方がβカロテン量が高く、かつ海藻湿重量増加も多かった。
【考察】本研究の結果からＩＡＡの添加が紅藻類オゴノリ科海藻の湿重量増加やβカロテン含有量増加に寄与していることが示唆された。今後海藻成長に最適なＩＡＡ濃度の詳細な検討を行う予定である。

seaweed, growth, carotenoids

講演番号：3A29p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟北 A29 会場

サイクリックボルタンメトリーを用いた Fe キレート錯体のフェントン活性評価
Cyclic voltammetric studies of Fenton reaction activities of iron-chelator complexes
○有賀 智子[1]、鈴木 俊宏[1]、朝海 敏昭[1]、鈴木 道生[2]、吉村 悦郎[3]([1]産総研　計量標準、[2]東大院農生科応生化、[3]放送大学)
○ Tomoko ARIGA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Toshiaki ASAKAI[1], Michio SUZUKI[2], Etsuro YOSHIMURA[3] ([1]AIST NMIJ, [2]UTokyo, [3]OUJ)

【緒言】発表者らは、3 価の鉄（Fe^{III}）キレート錯体の共存下でルミノールと過酸化水素（H_2O_2）が反応し化学発光を生じる現象（ルミノール反応）を用いて、植物試料中の Fe^{III} キレート錯体を高感度に検出する高速液体クロマトグラフィー（HPLC）ポストカラム法を開発した[1]。本法を用いて天然の Fe^{III} キレーターであるクエン酸、ニコチアナミン、ならびに合成の Fe^{III} キレーター（Synthetic Ferric Iron Chelator、以下 SFIC とする）であるエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、trans-1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸（CyDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（GEDTA）と Fe^{III} との各錯体を分析すると、Fe^{III}SFIC の検出感度が高い傾向があり中でも Fe^{III}EDTA と Fe^{III}CyDTA の検出感度が顕著に高かった。この理由として Fe^{II}EDTA と Fe^{II}CyDTA のフェントン活性が高いことが推測された。ルミノール反応において Fe^{III} キレート錯体は 2 価に還元されるが（反応式 1）、Fe^{II} キレート錯体が高いフェントン活性を有する場合、H_2O_2 存在下でフェントン反応（反応式 2）を起こして酸化され再び 3 価に戻るため、Fe^{III} キレート錯体は見かけ上消費されずルミノール反応が進行し続ける。本研究では、サイクリックボルタンメトリー（CV）を用いて 4 種類の $Fe^{II/III}$SFIC を分析し得られた CV 曲線を比較することで、各 Fe^{II}SFIC のフェントン活性を評価した。

$$Fe^{III}chelator + e^- \rightarrow Fe^{II}chelator \quad (1)$$

$$Fe^{II}chelator + H_2O_2 \rightarrow Fe^{III}chelator + OH^- + \bullet OH \quad (2)$$

【実験】4 種類の Fe^{III}SFIC 水溶液とその 20 倍濃度の SFIC 水溶液を等量ずつ混合した。この混合液に終濃度 1 mM の H_2O_2 を加えたもの（$+H_2O_2$）、加えないもの（$-H_2O_2$）、それぞれを pH 10.5 のホウ酸バッファーで希釈し、1 mM Fe^{III}SFIC と 20 mM SFIC を含む混合液を調製した（以下、Fe^{III}SFIC 混合液とする）。$+H_2O_2$ と $-H_2O_2$ の場合それぞれについて 4 種類の Fe^{III}SFIC 混合液を CV に供した。$+H_2O_2$、$-H_2O_2$ 間の $Fe^{II/III}$SFIC の還元ピークのピーク高さの差を Fe^{II}SFIC のフェントン活性として評価した。

【結果・考察】CV の結果から、フェントン活性は Fe^{II}EDTA、Fe^{II}CyDTA、Fe^{II}DTPA、Fe^{II}GEDTA の順で高いことが示され、HPLC ポストカラム法における検出感度の高さと Fe^{II} キレート錯体のフェントン活性の間には相関関係があることが示唆された。以上の結果から、CV を用いて高いフェントン活性を有する Fe^{III} キレーターを探索し、HPLC ポストカラム法を用いた Fe^{III} キレート錯体分析法に用いることによって、分析感度を更に向上できる可能性が示唆された。

[1] T. Ariga, Y. Imura, M. Suzuki, E. Yoshimura, *J. Chromatogr. B*, 1014, 75-82 (2016)

ferric iron chelator, Fenton reaction, cyclic voltammetry

発表責任者：有賀智子（t-ariga@aist.go.jp）

講演番号：3B02a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B02 会場

腸内環境を介した豆類由来タンパク質のエネルギー代謝制御機構の解明

Energy regulation by beans protein in gut environment

○中谷 明穂[1]、Li Xuan[1,2]、宮本 潤基[1,2]、橘 信彦[3]、河野 光登[3]、井上 啓[4]、木村 郁夫[1,2] ([1]東京農工大学大学院 農学研究院、[2]AMED-CREST、[3]不二製油グループ本社株式会社、[4]金沢大学 新学術創成研究機構)

○Akiho NAKATANI[1], Xuan Li[1,2], Junki MIYAMOTO[1,2], Nobuhiko TACHIBANA[3], Mitsutaka KOHNO[3], Hiroshi INOUE[4], Ikuo KIMURA[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]AMED-CREST, [3]Fuji Oil Holdings Inc., [4]Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University)

【背景・目的】

近年、食生活の欧米化や運動不足などの生活習慣の乱れが原因で引き起こされる生活習慣病とその関連疾患の蔓延が深刻な問題となっている。特に、血中・肝臓の脂肪量の増加はインスリン抵抗性の増大などを介して、脂質異常症のみならず糖尿病や高血圧、肝炎～肝硬変など多様な生活習慣病の発症・増悪因子となっている。一方、腸内細菌が宿主の脂質代謝制御に重要な役割を担っていることが、科学的根拠に基づいて明らかにされている（Turnbaugh PJ, et al. *Nature*. 2006）。このような腸内細菌の構成は食習慣に大きく影響されることから、食の重要性が見直されている。血中の中性脂肪（triglyceride; TG）量を減少させる食材として、腸管での脂肪吸収抑制を機序とした難消化性デキストリンなどが知られているが、主要な抗生活習慣病食材の中で植物由来タンパク食材は未だ普及していない。

金沢大・井上らは、これまでに、ある種の豆類由来タンパク質が血中の TG 量とともに、強力に肝臓脂肪量も減少させる作用を有することを見出している （Watanabe H, et al. *J Nutr*. 2017）。新たな機能性食材候補として期待される豆類由来タンパク質の抗生活習慣病作用メカニズムの解明を目指し、本研究では、豆類由来タンパク質の宿主エネルギー代謝改善作用と腸内細菌叢への影響について検討を行った。

【方法】

C57BL/6J 野生型マウスに、通常食・高脂肪食中のカゼインを豆類由来タンパク質に置換した飼料を負荷した。マウスを解剖後、血中および組織中の代謝パラメータを解析した。さらに、糞便中の腸内細菌組成および腸内細菌代謝産物の変化を調べた。

【結果・考察】

豆類由来タンパク質負荷による有意な体重・脂肪重量増加抑制効果が認められた。また、食餌の変化に伴って腸内細菌叢も変化していることが明らかとなり、豆類由来タンパク質の宿主代謝改善作用に腸内細菌およびその代謝物が関与している可能性が示唆された。肝臓への脂肪蓄積は糖尿病・脂質異常症などの生活習慣病の発症・増悪と密接に関連しており、その対策の必要性が認識されている。本研究結果は、豆類由来タンパク質の肝臓脂肪蓄積抑制作用メカニズムの解明に繋がり、新規機能性食品の開発と人々の食を通じた健康づくりに貢献できると期待される。

gut microbiota, hepatic steatosis, functional food

講演番号：3B02a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B02 会場

日本の食用きのこ摂取はマウスの肥満を抑制する。
The Japanese mushroom diet reduces obesity in mice.
○清水 崇光[1]、森 光一郎[1]、都築 毅[2] ([1]ホクト、[2]東北大院・農)
○TAKAMITSU SHIMIZU[1], KOICHIRO MORI[1], TSUYOSHI TSUDUKI[2] ([1]Hokuto, [2]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】日本人は様々な種類のきのこを 1 日 15 g 食べており、きのこは食事全体量の 0.7 %を占めている。きのこは食物繊維やビタミン類が含まれ、栄養的にも有能な食材である。近年の日本の食生活は、動物性脂肪の多い食事を摂取することが増え、肥満による生活習慣病が急増している。これまでに、きのこによる抗肥満に関する研究は多く報告されているものの、様々な種類の食用きのこを摂取可能な量で同時に摂取し、生体にどのような影響を及ぼすか調査した研究は殆ど行われていない。そこで本研究は、高脂肪食負荷マウスに日本で多く食べられている複数のきのこを含む食餌を摂取させることで、日々の食用きのこの摂取が、肥満抑制に効果があるのかを検証することにした。
【方法】日本で多く生産されているエノキタケ、ブナシメジ、シイタケ、マイタケ、エリンギを凍結乾燥し、これらきのこ凍結乾燥物を日本のきのこ生産量の割合に従って混合した。ヒト換算で生きのこを 1 日 100g および 600 g 摂取するように、高脂肪食にきのこ凍結乾燥混合物を 0.5% (ML 群) および 3.0 % (MH 群) 加え、試験食を作製した。C57BL/6J マウス (5 週齢、雄性) に試験食を 4 週間自由摂食させ、4 週間後の体重、臓器重量、血中生化学パラメーター、脂質代謝関連遺伝子発現量および糞便中の腸内細菌叢の変化を検証した。
【結果】MH 群は内臓脂肪の増加が有意に抑制され、脂肪細胞サイズの縮小が見られた。脂肪組織中の脂肪酸合成に関わる *Srebp1c* はきのこ容量依存的に減少し、脂肪分解に関わる *Hsl* はきのこ容量依存的に増加した。また、きのこの摂取が脂肪細胞からのアディポネクチン産生を促していることが示された。さらに、きのこの摂取は腸内細菌叢にも影響を及ぼし、一部の乳酸菌や短鎖脂肪酸産生菌の増加傾向が認められた。
【考察】きのこを含む食餌は内臓脂肪の脂肪酸合成抑制または脂肪分解促進により、脂肪の蓄積を抑制することが示唆された。このため、脂肪細胞は肥大化せずに、アディポネクチンの産生を促したと考えられた。また、一部の乳酸菌および短鎖脂肪酸産生菌がきのこ由来食物繊維を餌として増殖したことが示唆された。この事から、宿主のエネルギー代謝を促進する短鎖脂肪酸が体内で増加していることが考えられ、MH 群で見られた脂肪蓄積抑制効果に、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が一部関与していることが示唆された。以上のことから、きのこを含む食餌は肥満予防に有効な食材であることが明らかとなった。

Mushroom, Obesity, Gut microbiota

発表責任者：清水　崇光（takamitsu.shimizu@tohoku.ac.jp）

講演番号：3B02a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B02 会場

発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果

Effect of fermented milk Kefir to the energy metabolism of muscle cells

○本郷 玲奈[1]、松元 拓也[2]、徳丸 浩一郎[3]、白畑 實隆[4]、照屋 輝一郎[1,2,4]([1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]日本ケフィア、[4]九大院農院)
○Reina HONGO[1], Takuya MATSUMOTO[2], Koichiro TOKUMARU[3], SHIRAHATA Sanetaka[4], Kiichiro TERUYA[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci. Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci. Kyushu Univ., [3]Nihon Kefir Co. Ltd, [4]Fac. Agr. Kyushu Univ.)

【目的】

ケフィアは世界三大長寿地域のコーカサス地方発祥の発酵乳であり、複数の乳酸菌に加え酵母も発酵に関わることが特徴となっている。当研究室では、発酵乳ケフィアの健康への有用性に関して研究を行ってきた。近年、問題となっているメタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積に加え、動脈硬化危険因子が一個人に重積している状態である。メタボリックシンドロームの要因の一つとして、エネルギー代謝異常が挙げられる。本研究では、ケフィアの筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果を検討し、そのメタボリックシンドローム予防・改善効果の検討を目的とした。

【方法】

ケフィア標品は、日本ケフィア株式会社から提供された高タンパク質ケフィア（NKG ケフィア HPT）を使用した。分化誘導処理を行ったマウス由来 C2C12 筋管細胞に NKG ケフィアの処理を行った。48 時間処理後、WST-1/1-Methoxy PMS 溶液を添加した培地に交換し、WST-1 を発色後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度を測定し細胞の呼吸活性を評価した。また、細胞を 10%ホルマリンで固定後 Hoechst 33342 染色を行い、細胞 DNA 量を測定することで、細胞当たりの呼吸活性の評価を行った。さらに、ATP 測定試薬を用いて NKG ケフィアおよび他のサンプルを処理した際の C2C12 筋管細胞内 ATP 量を測定した。さらに、細胞のタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いて、タンパク質合成阻害下における細胞内 ATP 量の変化を検証した。

【結果・考察】

WST-1 アッセイと Hoechst 33342 染色の結果より、NKG ケフィア処理によって筋肉細胞 1 個当たりのエネルギー代謝の亢進効果が確認された。またその際に、筋管細胞内の ATP 量の減少が見られた。シクロヘキシミドを用いてタンパク質合成を阻害した場合、NKG ケフィア処理による細胞内 ATP 量の減少が抑制された。以上のことから、NKG ケフィアはエネルギー代謝亢進を介したメタボリックシンドロームの予防・改善効果を有することが示唆された。

Kefir, skeletal muscle, energy metabolism

講演番号：3B02a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B02 会場

２型糖尿病モデル動物を用いたビフィズス菌発酵乳の肥満抑制効果

Effect of bifidobacterium fermented milk on anti-obesity of diabetic animal model

○丸田 ひとみ[1]、王 承铎[2]、天満 晴菜[3]、馬 芸[1]、中村 昇二[4]、藤井 祐介[4]、豊川 直樹[4]、山下 広美[3]([1]岡県大院・保福・保福科、[2]岡県大院・保福・栄養、[3]岡県大・保福・栄養、[4]オハヨー乳業(株))
○Hitomi Maruta[1], Chengduo Wang[2], Haruna Tenma[3], Yun Ma[1], Syouji Nakamura[4], Yusuke Fujii[4], Naoki Toyokawa[4], Hiromi Yamashita[3] ([1]Oka-pu. Univ. Dr course, [2]Oka-pu. Univ. Mster course, [3]Oka-pu. Univ., [4]Ohayo Dairy Products Co., Ltd)

【目的】ビフィズス菌はヒトを含めた動物の消化管に棲息する偏性嫌気性細菌で、古くからヨーグルトの製造に用いられ、プロバイオティクスとしての有用性が認められている。ビフィズス菌のヒトに対する生理作用は、腸内環境の改善、アレルギー症状の改善、脂質代謝の改善、さらには感染防御作用など多岐にわたっており、ヒトの健康に寄与する機能性食品素材として注目されている。しかし、これまでのビフィズス菌を関与成分とする機能性ヨーグルトは整腸作用を謳ったものが多く、今後はそれに代わる新たな機能性ヨーグルトの開発が望まれる。そこで本研究では、ヒト乳児糞便由来ビフィズス菌株の中からヨーグルト開発に応用できる新規の機能性株を検索し、その菌株を利用して肥満抑制効果が期待できるビフィズス菌ヨーグルトを開発することを最終目標とした。ビフィズス菌は解糖系においてブドウ糖を分解してエネルギーを生成する際に、その最終生産物として乳酸以外に酢酸を生成することから、これまでに肥満抑制効果が報告されている酢酸に着目し、保存しているビフィズス菌の中から酢酸の生成能が高く、乳中での生育性と生残性に優れたビフィズス菌を選抜し、それら選抜菌株で作成した発酵乳を用いて動物への投与実験を行ない、肥満抑制効果を調べた。
【方法および結果】選抜したビフィズス菌株は 3 株（bif-15、bif-30、および bif-39）で、各菌株を GAM ブイヨンで培養後、得られた培養液を 12%脱脂乳に 4%量接種して 37℃で 24 時間培養したものをビフィズス菌発酵乳として動物投与実験に供試した。なお HPLC による測定の結果、ビフィズス菌発酵乳には 0.5～0.6%の酢酸が含まれていた。過食により肥満と糖尿病を発症する２型糖尿病モデル動物である OLETF ラットに各ビフィズス菌発酵乳を 5mL/Kg-体重で週 5 日間、胃ゾンデを用いて 8 週齢から 23 週齢まで投与を行い、24 週齢にて解剖を行った。対照群として、水、酢酸、スキムミルク投与群を同時に飼育した。飼育期間中は自由摂食、自由摂水とし、体重増加量、摂餌量、摂食効率などを測定し、4 週間に一回、呼気ガス分析による酸素消費量の測定および自発運動量を測定した。また、一定期間ごとに採血を行い、血液生化学検査値を測定した。解剖時には盲腸内容物を回収し、短鎖脂肪酸および糞中 DNA を抽出し、短鎖脂肪酸の定量及び細菌叢の解析を行った。さらに脂肪組織及び筋肉組織の遺伝子及びタンパク発現解析、組織化学解析を行った。それらの結果について報告する。

bifidobacterium, acetic acid, OLETF rat

講演番号：3B02a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B02 会場

プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と体温変化の解析
Propolis-derived component induces the formation of brown-like adipocytes and thermogenesis in mice.
○青山 広樹[1]、兵頭 拓真[1]、神谷 美沙[1]、西川 翔[1]、宮田 涼[2]、吉村 一輝[2]、熊澤 茂則[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2]静岡県大・食品栄養)
○Hiroki AOYAMA[1], Takuma HYODO[1], MISA KAMIYA[1], SHO NISHIKAWA[1], Ryo MIYATA[2], Kazuki YOSHIMURA[2], Shigenori KUMAZAWA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】
白色脂肪組織がエネルギー貯蔵器官であるのに対し、褐色脂肪組織は熱産生を行い、エネルギー消費を促進する。近年の研究から環境条件により、白色脂肪組織中で「誘導型」褐色脂肪細胞が増加（褐色脂肪細胞化）し、熱産生によりエネルギー消費を促進して体脂肪が減少することが明らかにされている。これまでに演者らは、食品由来因子としてブラジル産プロポリスに含まれる Artepillin C（ArtC）が PPARγのアゴニストとして作用し、PRDM16 タンパク質の分解を抑制することで褐色脂肪細胞化を促すこと、また、C57BL/6J マウスに ArtC を 4 週間経口投与すると、鼠蹊部白色脂肪組織に褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量が有意に上昇することを報告している[1, 2]。以上の背景を踏まえて本研究では、ArtC の投与による褐色脂肪細胞化誘導を介した体熱産生の上昇を明らかにすることを目的とした。
【方法】
C57BL/6J マウスに ArtC の①単回経口投与②持続的な経口投与を行った際の直腸及び脂肪組織（褐色脂肪組織，鼠蹊部白色脂肪組織）温度をデジタル温度計と温度プローブを用いて投与後 1 時間後まで持続的に測定した。さらに②の ArtC を持続的に経口投与を行った C57BL/6J マウスに急性寒冷暴露（4℃）を行い、デジタル温度計と温度プローブを用い直腸温度を測定し、熱産生能を検討した。
【結果】
C57BL/6J マウスに ArtC を単回経口投与した場合は、直腸及び脂肪組織温度において変化はみられなかった。一方 ArtC の持続的な投与は、Control 群と比較して ArtC 群で鼠蹊部白色脂肪組織内の有意な温度上昇が認められた。さらに ArtC を投与した C57BL/6J マウスを寒冷暴露すると、Control 群と比較して ArtC 投与群で有意な直腸温度低下の抑制が認められた。以上のことから、ArtC の投与による褐色脂肪細胞化誘導は、体温の上昇・維持を伴うことが明らかになった。現在、引き続き ArtC 投与による体温上昇のメカニズムと体脂肪蓄積の抑制作用についても検討を進めている。
1） 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨.
2） *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.

propolis, Brown-like adipocytes, thermogenesis

講演番号：3B02a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B02 会場

蛍光強度を指標とした非侵襲的 UCP1 転写活性評価モデルマウスの作出

Establishment of noninvasive fluorescent imaging model to detect UCP1 transcriptional activity

○川原崎 聡子[1]、桑田 秀俊[1]、坂本 智弥[1]、新田 貴大[1]、鄭 蕙芬[1]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,3]、荒 武[1]、高橋 信之[1,3]、冨田 江一[2]、後藤 剛[1,3]、河田 照雄[1,3] ([1]京大院農・食品生物、[2]高知大医、[3]京大・生理化学研究ユニット)

○ Satoko KAWARASAKI[1], Hidetoshi KUWATA[1], Tomoya SAKAMOTO[1], Takahiro NITTA[1], Huei-Fen JHENG[1], Haruya TAKAHASHI[1], Wataru NOMURA[1,3], Takeshi ARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1,3], Koichi TOMITA[2], Tsuyoshi GOTO[1,3], Teruo KAWADA[1,3] ([1]Div. Food Sci., Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Department of Neurobiology and Anatomy, Kochi Medical School, Kochi Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】　褐色脂肪組織は内在する脱共役タンパク質 1 (UCP1) を介して全身のエネルギー消費に寄与している。近年、寒冷曝露に代表される特定の刺激により白色脂肪組織でも UCP1 が発現することが報告されており、UCP1 発現調節機構の解明が肥満の予防・改善の新たなアプローチとなり得ると考えられる。そこで我々は、*in vivo* イメージングによって非侵襲的に UCP1 転写活性を評価可能な実験系を確立するため、蛍光タンパク質をレポーター遺伝子として用いたトランスジェニックマウスを作製し、その有効性について検討した。

【方法・結果】　Bacterial Artificial Chromosome (BAC)トランスジェニック技術を用い、マウス UCP1 遺伝子のゲノム DNA 配列を含む BAC クローンにレポーター遺伝子として赤色蛍光タンパク質 monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) の cDNA 配列を挿入し、トランスジェニックマウスを作製した。このマウスを *in vivo* イメージング装置にて観察したところ、成体および幼体マウスにおいて肩甲骨間に mRFP1 由来の蛍光が観察され、この蛍光が肩甲骨間褐色脂肪組織 (BAT) に由来することを確認した。蛍光強度および BAT における mRFP1 発現量と UCP1 発現量に有意な相関が認められた。また各組織における遺伝子発現を定量したところ、UCP1 発現組織特異的に mRFP1 が発現していることが確認された。成体マウスを寒冷条件下で飼育したところ肩甲骨間の蛍光強度が次第に増大し、その後室温条件下での飼育に戻すと蛍光強度が減弱する様子が観察された。この条件下においても蛍光強度と UCP1 発現量の間に有意な相関が認められた。また、β-アドレナリン受容体アゴニストである CL316,243 投与においても UCP1 発現量の増加および BAT の蛍光強度の増大が認められた。

【結論】　作製したトランスジェニックマウスが幼体から成体に渡って蛍光強度を指標として UCP1 遺伝子の転写活性を非侵襲的に評価可能なモデルマウスとなることが示唆された。

UCP1, mRFP1, *in vivo* imaging

講演番号：3B02a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B02 会場

DPP-4 阻害剤テネリグリプチンが脂肪組織の UCP-1 発現に与える影響
The effects of a DPP-4 inhibitor, Teneligliptin, on UCP-1 expression of adipose tissue
○澤崎 穂菜美[1]、武田 健一郎[1]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,2]、鄭 蕙芬[1]、荒 武[1]、高橋 信之[1,2]、大里 直樹[3]、瀬尾 茂人[3]、松田 秀雄[3]、河田 照雄[1]、後藤 剛[1] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]阪大院情報・バイオ情報工学)
○ Honami SAWAZAKI[1], Kenichiro TAKEDA[1], Haruya TAKAHASHI[1], Wataru NOMURA[1,2], Huei-fen JHENG[1], Takeshi ARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Naoki OSATO[3], Shigeto SENO[3], Hideo MATSUDA[3], Teruo KAWADA[1], Tsuyoshi GOTO[1] ([1]Div. Food Sci., Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Dep. Bioinform Engn., Grad. Sch. Inform Sci & Technol., Osaka Univ.)

〈目的〉褐色脂肪組織(BAT)は、脱共役タンパク質 1（UCP-1）の機能を介した高い熱産生能を有する組織であり、肥満や肥満に伴う代謝異常症との関連性が注目されている。DPP-4(Dipeptidyl Peptidase-4)は膵臓でのインスリン分泌を促進する GLP-1、GIP といったインクレチンの分解を担っている。その働きを阻害する DPP-4 阻害剤は単独投与では低血糖のリスクが小さいことから、糖尿病治療薬として臨床で広く用いられている。DPP-4 欠損マウスは耐糖能の亢進を示すことに加え、体重増加が抑制されることが報告されており、エネルギー代謝への関与が示唆される。本研究では、DPP-4 阻害剤テネリグリプチン投与が脂肪組織における UCP-1 の発現に与える影響について検討した。
〈方法・結果〉高脂肪食を負荷した C57BL/6N マウスに対してテネリグリプチン(120mg/kg/day)を飲水投与した結果、テネリグリプチン投与群で体重・体脂肪量の増加や脂肪細胞の肥大化が顕著に抑制されるとともに酸素消費量増加が認められ、エネルギー消費の亢進が示唆された。テネリグリプチン投与群の皮下脂肪組織において UCP-1 の発現が増加していたことから、BAT および白色脂肪組織(WAT)における UCP-1 発現増加がエネルギー消費の亢進に関与していることが示唆された。DPP-4 を皮下脂肪由来脂肪細胞に添加したところ、β-アドレナリン受容体作動薬による UCP-1 発現上昇を抑制し、この抑制はテネリグリプチン存在下で消失した。DPP-4 添加は細胞において ERK のリン酸化を促し、テネリグリプチンによって抑制された。また、protease activated receptor 2 (PAR2)の阻害剤である GB83 存在下では DPP-4 による ERK のリン酸化が抑制された。
〈結論〉DPP-4 は PAR2 を介した ERK の活性化により UCP-1 の発現誘導を抑制し、DPP-4 阻害剤はその抑制を解除することで、エネルギー代謝亢進作用を示すことが考えられた。

Adipose tissue, UCP-1, DPP-4

講演番号：3B02a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B02 会場

食餌性肥満(DIO)マウスにおける、アロエベラゲル抽出物(AVGE)投与による褐色脂肪組織に対する作用の検討

Effects of oral intake of *Aloe vera* gel extract on brown adipose tissue in diet induced obesity mice.

○多田 明日翔[1]、田中 美順[1]、三澤 江里子[1]、齊藤 万里江[1]、鍋島 かずみ[1]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、後藤 剛[2,3]、河田 照雄[2,3] ([1]森永乳業・素材応用研究所、[2]京都大学大学院農学研究科・食品生物科学専攻、[3]京都大学・学際融合教育研究推進センター)
○Asuka TADA[1], Miyuki TANAKA[1], Eriko MISAWA[1], Marie SAITO[1], Kazumi NABESHIMA[1], Kouji YAMAUCHI[1], Fumiaki ABE[1], Tsuyoshi GOTO[2,3], Teruo KAWADA[2,3] ([1]Food Ingredients & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co.,Ltd., [2]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]Center for the Promotion of Interdisciplinary Education and Research)

【背景・目的】エネルギーの貯蔵を担う白色脂肪組織に対し、褐色脂肪組織は代謝的熱産生を行い、エネルギー消費の調節や寒冷環境下での体温維持に寄与する。この熱産生を調節する分子としてミトコンドリア脱共役タンパク質（uncoupling protein：UCP）が知られている。また、寒冷刺激などの特定の刺激下で白色脂肪組織にも UCP が発現することが見出され（ベージュ化）、生体内のエネルギー消費への関与が示唆されている。近年では肝臓から産生される線維芽細胞増殖因子（FGF）21 が白色脂肪組織のベージュ化に寄与することも報告されている。これまでに我々は、アロエベラゲル粉末摂取が食餌性肥満モデルマウスにおいて抗肥満作用を示すこと、有効成分として我々が見出したアロエベラゲル由来の植物ステロール（アロエステロール）が褐色脂肪組織機能との関連性が報告されているペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPAR）リガンド活性を有することを確認している。そこで、本研究では食餌性肥満モデルにおけるアロエベラゲル抽出物（AVGE）の経口摂取による褐色脂肪組織への影響について検討した。
【方法】6 週齢の C57BL/6 マウスを通常食（STD）群、高脂肪食（HFD）群、高脂肪食+AVGE（HFD+AVGE）群の 3 群に分け、HFD 群および HFD+AVGE 群は高脂肪食（脂肪エネルギー比率：60%）により食餌性肥満を誘導した。高脂肪食切り替え 2 週間後より AVGE の経口投与を開始し（AVGE 20μg/10g 体重/日）、投与開始から 12 週間後に直腸温の測定を行い、解剖した。褐色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織、肝臓における遺伝子発現解析により、AVGE の効果を評価した。
【結果】DIO モデルマウスにおいて、AVGE 投与による直腸温の有意な上昇が確認された。また、褐色脂肪組織における UCP1、FGF21 の有意な発現上昇が認められた他、褐色脂肪の活性化マーカーの発現上昇を確認した。さらに、鼠蹊部白色脂肪組織においてベージュ化マーカーの発現上昇傾向が認められた。以上の結果から、AVGE は褐色脂肪組織を活性化し、深部体温の上昇効果を有すること、そのメカニズムとして FGF21 が関与している可能性が示唆された。

aloesterol, brown adipose tissue, UCP1

講演番号：3B02a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B02 会場

糖転移ヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化の誘導

Induction of brown-like adipocyte formation by α-glucosyl hesperidin

○西川 翔[1]、兵頭 拓真[1]、青山 広樹[1]、長尾 つばさ[1]、中西 章仁[2]、タンジャ マハマドゥ[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2]東洋精糖(株))
○ Sho NISHIKAWA[1], Takuma HYODO[1], Hiroki AOYAMA[1], Tsubasa NAGAO[1], Akihito NAKANISHI[2], Mahamadou TANDIA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Toyo Sugar Refining Co., LTD.)

【目的】哺乳動物の脂肪組織には褐色脂肪組織と白色脂肪組織がある。この内、褐色脂肪組織では、寒冷刺激など種々の環境条件に応じて熱産生が増加しエネルギー消費が促進する。近年の研究から、環境条件により白色脂肪組織において「誘導型」褐色脂肪細胞が増加 （褐色脂肪細胞化）し、熱産生によるエネルギー消費が増加し体脂肪が減少することが明らかにされている。これまでに演者らは、褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子とその作用機構を報告している [1),2)]。ヘスペリジン（HES）は柑橘類に含まれるフラボノイドとして知られるが、水に難溶で生体内吸収性が低い。このため、HES にグルコースを転移し水溶解性と生体内吸収性を高めた α－グルコシルヘスペリジン（αGH）が開発され活用されつつある。このような背景のもとで、本研究では αGH の新たな機能として褐色脂肪細胞化の誘導作用を明らかにすることを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウス（5 週齢、♂）に αGH を 4 週間混餌投与し、鼠蹊部白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を採取した。これらの組織について褐色脂肪細胞化に伴う形態変化を H&E 染色で観察した。さらに褐色脂肪細胞化マーカーである UCP1 タンパク質発現をウェスタンブロッティング及び免疫染色により評価した。さらに等量の HES 添加群についても同様に比較検討した。

【結果】αGH 摂取群では、鼠蹊部白色脂肪組織に褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量は有意に上昇した。しかし精巣上体白色脂肪組織では αGH による褐色脂肪細胞化誘導は認められず、肩甲骨間褐色脂肪組織では群間の差は認められなかった。一方 HES の摂取は αGH 摂取により観察された褐色脂肪細胞化を誘導しなかった。以上のことから HES ではなく、水溶解性と生体内吸収性を高めた αGH が褐色脂肪細胞化を誘導することを明らかにした。現在、引き続き作用機序の解明を進めている。

[1)] *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512. [2)] *Mol. Nutr. Food Res.* (2017) submitted.

α-glucosyl hesperidin, brown-like adipocyte, UCP1

講演番号：3B02a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B02 会場

ガーリック由来香気成分は、体熱産生非依存的に肥満を抑制する

Garlic-derived compound suppresses obesity independent of thermogenesis.

○瀬尾 希来、増澤（尾﨑）依、細野 崇、関 泰一郎（日大院・生資科・応生科）
○Kiki Seo, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad. School)

【目的】 肥満はさまざまな生活習慣病の原因となる。肥満の原因として熱産生に関与する褐色脂肪細胞の機能低下が報告されている。一方、褐色脂肪細胞の活性化作用や白色脂肪細胞を褐色化させる食品成分は、熱産生・エネルギー代謝を促進することで抗肥満作用を示すことが注目されている。いくつかの香辛料成分は、transient receptor potential チャネル（TRP チャネル）のアゴニストとして褐色脂肪組織における熱産生関連タンパク質の発現上昇や、エネルギー消費の増加を介して体重増加を抑制することが報告されている。ガーリックの香気成分である diallyl trisulfide (DATS)は、*in vitro* で TRP チャネルを活性化するが、体熱産生に及ぼす影響は明らかにされていない。本研究では DATS が体熱産生を促進し、高脂肪食による体重増加を抑制するか明らかにしようとした。
【方法】 Sprague Dawley (SD)雄性ラットを 2 週間の予備飼育後、DATS 群と Vehicle 群に分け、AIN-76 に基づいた高脂肪食 (60% kcal fat)を自由に摂餌させた。実験期間中 2 日に一回 DATS (500 μmol/kg b.w.) もしくは Vehicle (メチルセルロース)の経口投与を行い、投与開始 7 週目に血液、各種脂肪組織を採取し、血漿トリグリセリド、コレステロール濃度を市販のキットにより、褐色脂肪組織と鼠径部脂肪組織における UCP-1 発現量を Western blotting により測定した。さらに SD ラットの腹腔内に小型の温度計を移植して経時的な深部体温の測定が可能な測定系を確立し、DATS の経口投与がラットの深部体温に及ぼす影響について検討した。
【結果】 DATS 群と Vehicle 群の摂餌量に差はなかったが、DATS 群の体重増加は有意に抑制された。さらに DATS 群の精巣上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、鼠径部脂肪組織の重量と血漿トリグリセリド濃度は Vehicle 群と比較して有意に低下した。一方、血漿総コレステロール濃度に差はなかった。褐色脂肪組織、 鼠径部脂肪組織における UCP-1 発現は両群で差はなく、深部体温についても DATS 投与による影響はなかった。
【結論】 DATS は、*in vitro* で TRP チャネルを活性化するが、高脂肪食摂餌ラットの脂肪組織における UCP-1 タンパク質発現量や体熱産生に影響を及ぼさなかった。DATS は体熱産生には影響を及ぼさずに抗肥満作用を示すことが明らかとなった。

thermogenesis, Diallyl trisulfide, obesity

発表責任者：関 泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B02a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B02 会場

人工消化物の静脈内投与によるチョウザメ由来コラーゲンペプチドの血糖上昇抑制作用機序の検討
Investigation of improvement in glucose tolerance by sturgeon collagen peptides using an intravenous injection of *in vitro* digests.
○笹岡 友季穂、岸村 栄毅（北大院水）
○Yukiho SASAOKA, Hideki KISHIMURA (Hokkaido Univ.)

【目的】先に我々は、コラーゲンを豊富に含むチョウザメの皮、骨、鰭(未利用部)からコラーゲンペプチド(SCP)を調製し、マウス及びラットを用いた糖負荷試験において血糖上昇抑制作用を示すことを明らかにした。その作用機序として、SCP 静脈内投与試験の結果から、小腸から体内に吸収された SCP が血糖依存的に体内で糖代謝促進作用を示すことが示唆された。しかし、SCP は消化管にて種々の消化酵素により消化された後、小腸から吸収され血中へ移行すると予想される。そこで、生理的条件に近づけるために、SCP を *in vitro* で人工消化し、消化物を静脈内投与した際の血糖上昇抑制作用を検討した。
【方法】チョウザメはベステル種(*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*)を用いた。未利用部を 50℃でパパイン消化後、その遠心上清を凍結乾燥してエタノール処理により脱脂し、これを SCP とした。(1)SCP の DPP-4 阻害活性は、市販キットを用いて 405 nm における吸光度測定により行った。(2)SCP を 37℃でペプシン及びパンクレアチンにより連続的に消化した。その遠心上清を凍結乾燥し、これを脱塩処理した（ペプシン-パンクレアチン消化 SCP)。ペプシン-パンクレアチン消化 SCP を 37℃でプロナーゼ消化し、その遠心上清を凍結乾燥した（プロナーゼ消化 SCP)。各消化 SCP の消化度は、TNBS 法により測定した。(3)SCP をアミノ酸組成分析し、アミノ酸組成比と当量となるよう、市販アミノ酸を混合した(アミノ酸 Mix)。グルタミン/グルタミン酸及びアスパラギン/アスパラギン酸の比率は、アムール種(*Acipenser scherenckii*)のアミノ酸配列情報より推定した。(4)試料静脈内投与-グルコース腹腔内投与試験では、ICR マウスに 1.5 g/kg 体重の消化 SCP またはアミノ酸 Mix を静脈内投与後、速やかに 2.0 g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与し、血糖値の経時変化を測定した。
【結果】(1) *in vitro* において、SCP は DPP-4 阻害活性を示した。(2)ペプシン-パンクレアチン消化 SCP の消化度は 13.2%であり、プロナーゼ消化 SCP の消化度は 17.5%であった。試料静脈内投与-グルコース腹腔内投与試験において、SCP 群では対照群に対して血糖値が有意に低下し($P<0.05$)、ペプシン-パンクレアチン消化 SCP 群では血糖の上昇が抑制される傾向が認められた。プロナーゼ消化 SCP 群においても、血糖の上昇が抑制される傾向が認められた。(3)アミノ酸 Mix 静脈内投与-グルコース腹腔内投与試験において、SCP 群及びアミノ酸 Mix 群の血糖値が有意に低下した($P<0.05$)。以上の結果から、SCP は体内で消化酵素により消化された後、小腸から体内に吸収されるが、ペプチド態及びアミノ酸態のいずれにおいても体内で血糖上昇抑制作用を示すことが示唆された。

Sturgeon, Collagen peptides, Intravenous injection

発表責任者：岸村　栄毅（kishi@fish.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B02a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B02 会場

Plectranthus barbatus の抗メタボリックシンドローム作用

Anti metabolic syndrome effect of *Plectranthus barbatus*

○加藤 悠理海、小林 菜奈、成田 優里、只石 幹、清水 誠、服部 一夫（東農大応生科）
○Yuria KATO, Nana KOBAYASHI, Yuri NARITA, Miki TADAISHI, Makoto SHIMIZU, Kazuo HATTORI (Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】脂肪細胞には、トリグリセリドを蓄積するだけではなく、生理活性物質の分泌作用がある。特に、その生理活性物質であるアディポネクチンはインスリン抵抗性の改善などにより、抗メタボリックシンドローム作用を有することが分かっている。3T3-L1 脂肪細胞を用いた我々の *in vitro* 先行研究において、*Plectranthus barbatus* の葉メタノール抽出物（PBLM）が、脂肪細胞の分化を促進し、アディポネクチン産生を誘導したことから、抗メタボリックシンドローム作用を有することが示唆された。そこで本研究では、KK-A^{y}/TaJcl マウスを用い、*in vivo* における PBLM の抗メタボリックシンドローム作用について検討した。

【方法】8 週齢の KK-A^{y}/TaJcl 雄性マウスを、AIN-93M 精製飼料群（control 群）、0.25%PBLM 混餌群（0.25%群）と 1%PBLM 混餌群（1%群）の 3 群に分け（n=8- 9）、試験飼育を 5 週間行った。血糖値は 1 週間ごとに測定し、4 週目にインスリン負荷試験を行った。5 週目に解剖し、副睾丸周辺脂肪、消化管周辺脂肪、腹部周辺脂肪、肝臓、腓腹筋、大腿四頭筋の重量を測定した。また、血漿および肝臓中の生化学的パラメーターをそれぞれのキットを用いて測定した。さらに、副睾丸周辺脂肪を用いて、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ（PPARγ）やアディポネクチンなどの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した。

【結果・考察】体重増加量、各臓器重量において、3 群間に有意な差は認められなかった。血糖値は 5 週目の測定で、control 群に比して 1%群で有意に低下した。インスリン投与後の血糖値の変動により評価するインスリン負荷試験では、control 群に比してインスリン投与後 90 分において 0.25%群で、投与後 150 分においては 0.25%群、1%群ともに血糖値が有意に低下した。また、血漿中インスリン濃度も control 群に比し、1%群において低下傾向を示したことから、PBLM はインスリン抵抗性を改善する作用を有することが示唆された。血漿中のトリグリセリド濃度、遊離脂肪酸濃度および肝臓のトリグリセリド濃度は 3 群間において有意な差は認められなかった。脂肪組織の mRNA 発現量は、control 群に比し 1%群において PPARγ が増加傾向を示し、その制御を受けるアディポネクチン、aP2 は有意に増加した。これらのことから、PBLM によるインスリン抵抗性の改善および血糖値の低下は、PPARγ やアディポネクチンが関与する可能性が示唆された。以上より、本研究は PBLM が 2 型糖尿病に対する機能性素材となりうる可能性を示した。

Plectranthus barbatus, metabolic syndrome, insulin resistance

講演番号：3B02a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B02 会場

サツマイモ焼酎粕発酵物のメタボリックシンドローム予防効果
Preventive effect of metabolic syndrome by fermented products made from sweetpotato *shochu* distillery by-product

○小境 敏揮[1,3]、野別 亮[2]、鈴木 彩花[2]、章 超[3]、河野 邦晃[3]、岩井 謙一[3]、髙瀬 良和[3]、西山 和夫[1,2]、山崎 正夫[1,2] ([1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科、[2]宮崎大学農学部、[3]霧島酒造)
○Toshiki KOSAKAI[1,3], Ryo NOBETSU[2], Ayaka SUZUKI[2], Cho SHO[3], Kuniaki KAWANO[3], Ken-ichi IWAI[3], Yoshikazu TAKASE[3], Kazuo NISHIYAMA[1,2], Masao YAMASAKI[1,2] ([1]Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, [2]Graduate School of Agriculture, University of Miyazaki, [3]Kirishima shuzo Co., Ltd.)

＜背景・目的＞
エネルギーの摂取と消費のバランスが崩れることによって引き起こされる肥満による生活習慣病の増加が問題となっており、食品による予防が期待されている。麹菌は、焼酎や清酒、味噌、醤油など日本の伝統的な醸造・発酵食品に広く用いられてきた微生物の 1 つである。米や麦などの穀物に麹菌を固体培養させて造った麹は、主に原料由来のデンプンを分解するための酵素源として用いられてきた。しかしながら、麹菌そのものの健康機能に関する報告は未だない。そこで本研究では、サツマイモ焼酎粕の液体部分を培地として利用し、麹菌を液体培養して得られた焼酎粕発酵物を新たな食品素材として提案するとともに、その糖及び脂質代謝に与える影響を明らかにすることを目的とした。

＜方法＞
サツマイモ焼酎粕は、霧島酒造本社工場よりサンプリングし、固液分離と膜濾過を経て清澄化した液体部分を培地として用いた。種麹より調製した分生子懸濁液を培地に接種し、麹菌を培養した。得られた菌体を凍結乾燥後に粉砕して、実験サンプルとした（FPs)。実験動物として C57BL/6J マウスを用い、通常食と 2、5、10%の FPs を混ぜた餌を与える 4 群に分けてそれぞれ給餌した。8 週間の飼育後に屠殺を行い、血清及び各臓器を解析した。

＜結果・考察＞
摂食量及び飲水量に食餌の影響はみられなかったが、飼育後期の体重増加量は通常食群と比較して FPs 5%群と 10%群において有意に減少した。さらに精巣上体脂肪組織、腎周囲脂肪組織重量は、FPs 10%群において有意に減少し、血清コレステロールレベルも有意に減少した。以上の結果から、FPs は体脂肪減少作用及び血清コレステロール低下作用を有する食品素材として有用であることが示唆された。

metabolic syndrome, koji, sweetpotato *shochu* distillery by-product

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3B02a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B02 会場

高脂肪食誘発肥満モデルマウスにおけるゴボウスプラウトエキスの抗肥満作用

Anti-obesity effects of burdock sprout extract on high fat diet-induced obesity in mice

○渡部 晋平、大野 晶子、与茂田 敏、稲益 悟志（クラシエホールディングス株式会社　経営企画室企画部 R&D 戦略推進チーム）
○Shimpei WATANABE, Akiko OHNO, Satoshi YOMODA, Satoshi INAMASU (R&D Innovation Group, Kracie Holdings, Ltd.)

【背景】
植物のスプラウト（新芽）には、その後の成長過程で失われるポリフェノールなどの成分が豊富に含まれることが報告されており、その機能性、及び、利用が注目されている。ゴボウに含まれるリグナン化合物であるアルクチゲニンもその一つであり、成長したゴボウの根や葉にも微量に含まれているが、スプラウト中には多量に存在している。アルクチゲニンは、抗炎症作用や抗酸化作用、抗肥満作用などの生理活性を有することが知られている。そこで今回我々は、アルクチゲニンを高含有したゴボウスプラウトエキス末（GSE）を機能性食品素材として活用すべく、高脂肪食誘発肥満モデルマウスに対する抗肥満作用を検討した。
【実験方法】
5 週齢の C57BL/6J マウスを、Control 群（通常食摂取）、HFD 群（高脂肪食摂取）、GSE2%群（2% GSE 配合高脂肪食摂取）、GSE5%群（5% GSE 配合高脂肪食摂取）、の計 4 群（各群 n=6）にわけ、12 週間混餌投与を行った。投与期間中は週に 1 度体重を測定し、投与 10 週目には空腹時血糖を測定した。投与期間終了後、血清および臓器（肝臓、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪）を摘出し、得られた生体試料を用いて臓器重量や血中因子などの肥満関連指標の測定を行った。
【結果・考察】
Control 群と比較して HFD 群は体重、肝臓重量、内蔵脂肪重量、空腹時血糖、肝臓中 TG、血中 T-CHO、AST、ALT、レプチン、インスリンなどの有意な増加が認められた。これに対し、GSE 投与群は HFD 群と比較し、上述したいずれの指標においても用量依存的な改善が認められ、特に GSE5%群では有意な抑制作用が認められた。我々は同モデルにて、アルクチゲニン単独の投与でも体重や血中脂質、血糖値の増加抑制作用や脂肪肝の抑制作用などを確認しており、GSE による抗肥満作用についてもアルクチゲニンが寄与していると考えられる。以上の結果より、アルクチゲニンを高含有する GSE は、肥満やそれに関わる生活習慣病の予防や改善に有用な素材である可能性が示された。GSE による抗肥満作用の詳細なメカニズムに関しては、脂肪組織および肝臓の遺伝子、タンパク質発現解析を実施し検討する予定である。

burdock sprout, arctigenin, obesity

発表責任者：稲益　悟志（s.inamasu@kracie.co.jp）

講演番号：3B02a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B02 会場

昼夜逆転摂食とシフト摂食など不規則な摂食タイミングによる肝臓概日時計と脂質代謝の異常
Liver clock and lipid metabolism disorders are brought by the rest phase and the shift schedule food intake.

○渡辺 彩子[1]、片岡 裕太郎[1]、小林 悟[1]、梅木 美樹[2]、望月 聡[2]、小田 裕昭[1] ([1]名大院生命農、[2]大分教育)
○Ayako Watanabe[1], Yutaro Kataoka[1], Satoru Kobayashi[1], Miki Umeki[2], Satoshi Mochizuki[2], Hiroaki Oda[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Oita Univ.)

【目的】　哺乳類では概日時計のマスタークロックが脳視床下部の視交叉上核(SCN)にあり，全ての末梢組織にもそれぞれ概日時計がある．SCN の時計は光を同調因子とし，肝臓などの末梢組織の概日時計は摂食を同調因子としている．シフトワーカーや夜食症候群では，メタボリックシンドロームなどの代謝異常が起こることが知られているが，そのメカニズムは全く分かっていない．そこで本研究では，SCN 時計と末梢組織時計の協調の乱れが脂質代謝異常の原因と考えた．ラットを用いて，摂食タイミングを昼夜逆転させたモデル，摂食タイミングを一定の期間ごとでシフトさせたモデルを作成し，これらの摂食タイミングが肝臓の時計の異常を介して，代謝リズム異常，特に脂質代謝異常に及ぼす影響を検討した．
【方法】　高コレステロール食を３週間与えて，高コレステロール血症にした８週齢の雄性ラットを用いた．自由摂食群，逆転摂食群（休息期のみ摂食），シフト摂食群（１週間おきに活動期と休息期で交代した摂食）の３群に分けて，それぞれに高コレステロール食を与えた．１２時間の明暗交代下で７０日間飼育後，実験最終日（シフト摂食群は活動期に食餌を与えた最終週）に４時間ごとに７点で屠殺し，血清および肝臓，脂肪を摘出し，各組織から抽出した RNA の解析を行った．
【結果】　逆転摂食群とシフト摂食群で血中コレステロール濃度は高値を示した．これは VLDL コレステロールの増加によるものであった．肝臓における時計遺伝子（*CLOCK, BMAL1, DBP*）のリズムは，いずれの群も摂食タイミングによって同調していた．しかし，*DEC1/2* は逆転摂食群とシフト摂食群で，摂食タイミングに同調せず，そのリズムが崩れた．また，脂肪酸合成に関わる *FAS* と *ACLY*，コレステロール異化の *CYP7A1* が，逆転摂食と自由摂食群で，摂食タイミングによって同調せず，異常なリズムを示すとともに，mRNA 量も多くなっていた．つまり，肝臓の時計遺伝子は摂食タイミングに同調するものの，時計遺伝子によって制御を受ける脂質代謝関連の遺伝子の発現リズムが，逆転摂食群とシフト摂食群で同調せずに異常を起こしたことが明らかになった．したがって，たとえ摂食に一定の規則性があっても，活動期に食事を摂取しない場合，脂質代謝が異常になることを示している．これらの結果から，正常な肝臓の脂質代謝は，摂食同調性の肝臓時計からの制御だけではなく，光同調性の SCN 時計の制御を受けることが示唆された．以上の結果から，夜食症候群やシフトワーカーで報告されている脂質代謝異常が，肝臓時計と SCN 時計の臓器間協調が崩れるために起こっていることが示唆された．

Circadian rhythm, Night eating syndrome, Shift eating

発表責任者：渡辺彩子（watanabe.ayako@i.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B02p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B02 会場

筋分化誘導型オリゴ DNA は横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する

Myogenic-type oligodeoxynucleotide suppresses growth of rhabdomyosarcoma cells

○進士 彩華[1]、中村 駿一[1]、二橋 佑磨[2]、梅澤 公二[1,3]、下里 剛士[4]、高谷 智英[1,3]（[1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研、[4]信州大菌類・微生物セ）
○Sayaka SHINJI[1], Shunichi NAKAMURA[1], Yuma NIHASHI[2], Koji UMEZAWA[1,3], Takeshi SHIMOSATO[4], Tomohide TAKAYA[1,3] ([1]Fac. Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [3]IBS, Shinshu Univ., [4]CFMD, Shinshu Univ.)

【背景・目的】

微生物ゲノム由来のオリゴ DNA（ODN）は、塩基配列によって多彩な免疫機能を発揮することが知られている。しかしこれまで、免疫系以外に作用する ODN の報告はなかった。我々は最近、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来する ODN ライブラリを用い、マウス骨格筋幹細胞（筋芽細胞）への作用をスクリーニングした結果、筋分化を強力に促進する一連の新規 ODN 群（myogenic ODN; myoDN）を同定した。本研究では、骨格筋を発生母地とする横紋筋肉腫（rhabdomyosarcoma; RMS）に対する myoDN の作用を検討した。RMS は小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍である。高リスク患者には超大量化学療法が試みられるが、治療後の生存率は 30%前後であり、標準的な治療法は確立されていない。一部の RMS は筋芽細胞が起源と考えられ、骨格筋特異的な転写因子や構造タンパク質を発現している。そこで、myoDN によって筋分化を促進することができれば、RMS の増殖が抑制されるのではないかと考えた。

【方法・結果】

ヒト患者の横紋筋肉腫瘍から樹立された細胞株 ERMS1（5 歳女児骨盤由来）、RD（頸部由来）、KYM1（7 歳女児骨盤由来）を試験に用いた。これらの細胞に 10 uM の myoDN を投与して培養し、24 時間ごとに細胞数を計測した。p53 遺伝子に変異を有する ERMS1 の増殖は、myoDN で抑制されなかった。一方、RD の増殖は myoDN 投与 96 時間後に有意に抑制され、KYM1 の増殖は myoDN 投与 48 時間後から濃度依存的に抑制された。これらの結果から、myoDN の効果は RMS 細胞株によって異なることがわかった。

次に、myoDN を投与した細胞における遺伝子発現を qPCR で定量した。myoDN 投与群では、myogenin やミオシン重鎖の骨格筋分化マーカーの発現が上昇し、細胞分裂マーカーKi67 の発現が減少していた。一方で、アポトーシス関連遺伝子である Bax、Bcl-2、Bcl-xL の発現量は、myoDN を投与しても変化しなかった。以上の実験から、myoDN は RMS の骨格筋分化を誘導することで細胞周期を停止させ、その結果として RMS の増殖が抑制されることが示唆された。

現在、myoDN の構造活性相関の解析を進めている。今後、動物試験で myoDN の RMS 増殖抑制効果を検証することで、RMS を標的とした新規核酸医薬品の開発につながることが期待される。

Rhabdomyosarcoma, Oligodeoxynucleotide, Lactic acid bacteria

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B02 会場

生薬分子ベルベリンおよびパルマチンは横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する
Berberine and palmatine suppress growth of rhabdomyosarcoma cells
○中村 駿一[1]、進士 彩華[1]、二橋 佑麿[2]、梅澤 公二[1,3]、高谷 智英[1,3] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研)
○Shunichi NAKAMURA[1], Sayaka SHINJI[1], Yuma NIHASHI[2], Koji UMEZAWA[1,3], Tomohide TAKAYA[1,3] ([1]Fac. Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [3]IBS, Shinshu Univ.)

ミカン科の落葉高木であるキハダ *Phellodendron amurense* の樹皮を乾燥させたオウバクは、消炎・解熱作用を有する生薬として用いられてきた。オウバクの主成分であるベルベリンは、ベンジルイソキノリンアルカロイドの一種であり、塩化ベルベリン製剤は整腸用の市販薬にも含有されている。ベルベリンは抗腫瘍作用を示すことが知られており、肝臓癌、結腸癌、胆管癌、舌癌細胞の増殖を抑制することが報告されている。しかし、肉腫である横紋筋肉腫（rhabdomyosarcoma; RMS）に対するベルベリンの作用についての報告はない。RMS は骨格筋を発生母地とする腫瘍であり、小児で最も発生頻度の高い軟部悪性腫瘍として知られている。標準的な治療法は確立されておらず、高リスク患者の治療後生存率はいまだ 30%前後に留まる。

本研究では、ベルベリンおよびその類縁体であるパルマチンが、RMS 細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。ヒト患者の RMS から樹立された細胞株 ERMS1（5 歳女児骨盤由来）、RD（頸部由来）、KYM1（7 歳女児骨盤由来）を試験に用いた。接着培養したこれらの細胞に、1, 3, 10 uM のベルベリンもしくはパルマチンを投与し、24 時間ごとに細胞数を計測した。48-96 時間後には、いずれの RMS 細胞でもベルベリンによる濃度依存的な細胞増殖の抑制が認められた。qPCR により遺伝子発現を定量した結果、10 uM のベルベリンを投与した RD と KYM1 では細胞分裂マーカーKi67 の発現が減少し、ERMS1 では細胞周期阻害因子である p57 の発現が増加することを認めた。一方、パルマチンによる RMS 細胞の増殖抑制効果は、ベルベリンと比較して弱かった。特に、パルマチンは ERMS1 の増殖を全く抑制しなかった。

生体内における腫瘍の増殖を模すために、RMS 細胞をハンギングドロップ法で培養し、肉腫塊の形成を試みた。培養条件を検討した結果、ハンギングドロップ後に浮遊培養を続けることで、RD 細胞塊を持続的に成長させることに成功した。浮遊培養下で 10 uM のベルベリンを投与すると、4 日目以降に RD 細胞塊の成長が有意に阻害された。これらの観察から、ベルベリンは横紋筋肉腫の三次元的な増殖を抑制し得ることが示唆された。また、接着培養での結果とは異なり、パルマチンもベルベリンと同程度に浮遊 RD 細胞塊の成長を阻害した。

以上の結果から、植物性生薬のアルカロイド成分であるベルベリンおよびパルマチンは、抗 RMS 作用を有する安全・安価な分子として、RMS の治療薬として有用である可能性が示された。

rhabdomyosarcoma, berberine, palmatine

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B02 会場

赤シソ由来メトキシフラバノン PDMF の p53 依存性癌抑制作用とチロシンキナーゼ阻害剤併用による相乗的抗腫瘍効果

p53-driven tumor suppression by a *Perilla frutescens*-derived methoxyflavanone (PDMF) and its synergistic anti-tumor potency with tyrosine kinase inhibitors

藤村 孝志[1]、MOHAMED Amer Ali Abdelhafeez[1]、宮本 泰輔[2]、平川 規子[3]、馬場 堅治[3]、小埜 和久[1]、○河本 正次[1]([1]広島大院・先端・生命機能、[2]広島大・工・発酵工学、[3]三島食品・研究所)
Takashi FUJIMURA[1], Amer Ali Abdelhafeez MOHAMED[1], Taisuke MIYAMOTO[2], Noriko HIRAKAWA[3], Kenji BABA[3], Kazuhisa ONO[1], ○ Seiji KAWAMOTO[1] ([1]Grad. Sch. ADSM, Hiroshima Univ., [2]Fac. Eng., Hiroshima Univ., [3]Mishima Foods Co., Ltd.)

【目的】

我々は以前の本大会において赤シソ（*Perilla frutescens*）由来の新規メトキシフラバノン（PDMF; 8-hydroxy-5,7-dimethoxyflavanone）が著明な I 型アレルギー反応抑制効果を示すことを報告した。本分子は癌細胞の生存増殖シグナリング因子 Akt を分子標的とすることから、本研究では PDMF の制癌作用を検証すると共に、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】

PDMF はヒト肺腺癌細胞株 A549 の増殖を著明に抑制するのみならず、その生存率を有意に低下させた。PDMF による本抗癌作用は、G_2/M 期における細胞周期の停止、ならびにアポトーシスの誘導によるものであることが判明した。PDMF 刺激は A549 細胞における p53 の Ser15 リン酸化を亢進させると共にそのタンパク質レベルも増大させており、特に後者の表現型は p53 の MDM2 によるユビキチン化分解経路の促進因子である Akt の直接的抑制によってもたらされていることが示唆された。また、PDMF による G_2/M 期細胞周期停止とアポトーシス誘導は p53 のノックダウンにより共に消失したことから、本分子は p53 をターゲットとして制癌作用を発揮しうることが示された。

更に我々は、PDMF が抗癌性チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）との併用により著明かつ相乗的な抗腫瘍活性を示すことを見いだした。興味深いことに、PDMF と TKI によるこの相乗的制癌作用は、PDMF の作用濃度に依存した二相性の細胞周期停止機構（低濃度における G_2/M 期停止、および高濃度における *de novo* G_1 期停止）によりもたらされる一方で起アポトーシス活性には何らインパクトを与えていないこと、また、当該細胞周期停止機構がそれぞれ G_2/M 期サイクリン/CDK（サイクリン B1/CDK1）レベルの低下、および、$p21^{Cip1/Waf1}$ レベルの上昇を伴っていることが観察された。

【結論】

以上の結果から、赤シソ由来メトキシフラバノン PDMF が p53 を分子標的とした癌予防効果を有すること、および抗癌性 TKI との併用により著明な制癌作用を発揮しうることが明らかとなった。

flavanone, *Perilla frutescens*, p53

発表責任者：河本　正次（skawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3B02p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B02 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタマメ抽出物の併用による抗腫瘍作用の増強

Enhancement of anti-tumor effects by combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan and sword bean extracts

○立岩 宏彬[1]、宮本 菜摘[1]、江藤 博[2]、白畑 實隆[3]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院生物生資環、[2]第一産業(株)、[3]九大院農院)
○Hiroaki TATEIWA[1], Natsumi MIYAMOTO[1], Hiroshi ETOU[2], Sanetaka SHIRAHATA[3], Kiitirou TERUYA[1,3] ([1]Grad. Sch. Bioenv. Sci. Kyusyu Univ., [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd, [3]Fac. Agr. Kyusyu Univ)

[目的]

褐藻由来の硫酸化多糖類であるフコイダンを低分子化した酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）には、免疫賦活作用、血管新生抑制作用、アポトーシス誘導作用の 3 つの作用が報告されており、これらの作用により抗がん作用があると考えられている。また、ナタマメ（*Canavalia gladiata*）にはレクチンの一種である Concanavalin A（以下 Con A）が含まれている。これまでに LMF と Con A の併用処理を行うと抗がん作用が増強されることを明らかにした。しかし、ナタマメ中の他の活性成分の関与は明らかにされていない。そこで、本研究ではナタマメ中の活性成分及び作用機構を明らかにすることを目的とした。

[方法]

本研究では、ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080 及びヒト正常線維芽細胞 TIG-1 を使用した。酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）及びナタマメ抽出液は第一産業株式会社より提供されたものを使用した。ナタマメ抽出液の分子量分画は Sephadex G-25 カラムにより行った。各細胞は 10% FBS を添加した MEM 培地中で 37℃、5% CO_2／95% Air 下で培養を行った。HT1080 細胞を 2.0×10^4 cells/mL、TIG-1 を 2.5×10^4 cells/mL の細胞密度で播種し、24 時間前培養後、LMF 単独処理、または分子量分画を行った各ナタマメ抽出液との併用処理を行い、72 時間後に WST-1 Assay による細胞の代謝活性の測定及び Hoechst 33342 での核染色を行った後、蛍光強度測定を行い、細胞数を算出した。

[結果と考察]

HT1080 細胞において、LMF 単独処理では濃度依存的な細胞死誘導効果が確認された。また、LMF 単独処理よりもナタマメ抽出液と LMF の併用処理の方において強い細胞増殖抑制効果が見られた。さらにナタマメ抽出液の分子量 5,000 以下の画分と LMF の併用処理において特に強い細胞増殖抑制効果が見られた。TIG-1 細胞においては、HT1080 細胞で細胞死誘導効果が見られた条件において、顕著な細胞死誘導効果は見られなかった。

fucoidan, sword bean, anti-cancer

講演番号：3B02p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B02 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物とケトン体併用による抗腫瘍効果

Anti-tumor effects of combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and ketone body

○尾崎 健[1]、江藤 博[2]、白畑 實隆[3]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院生生資環、[2]第一産業(株)、[3]九大院農院)
○Ken OZAKI[1], Hiroshi ETO[2], Sanetaka SHIRAHATA[3], Kiichiro TERUYA[1,3] ([1]Grad. Sch. Bioers. Bioenv. Sci. Kyusyu Univ, [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd, [3]Fac.Agr.Kyusyu Univ)

[目的]

フコイダンはコンブやモズクなどに含まれる粘性硫酸化多糖類であり、様々な生理活性が報告されている。このフコイダンを低分子化した酵素消化低分子化フコイダン(LMF)には、アポトーシス誘導などの作用があると報告されている。また新たながん治療法としてがん細胞に見られる Warburg 効果に着目した治療法が考えられている。その一つとして、ケトン体を利用したものがある。ケトン体は生体内でグルコースが枯渇した時に肝臓で合成される化合物で、大部分の正常細胞はケトン体をエネルギー(ATP)生産の基質として利用できるが、がん細胞では Warburg 効果のため有効利用ができない。そこでケトン体による抗腫瘍効果、ケトン体と LMF を併用した場合の抗腫瘍効果、さらに糖代謝経路を阻害し LMF を併用することによる抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

[方法]

ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 は 10% FBS 添加 MEM 培地で培養を行い、ヒト結腸腺がん由来細胞株 HCT116 及びヒト乳腺がん由来細胞株 MDA-MB-231 は 10% FBS 添加 DMEM 培地で培養を行い、実験に使用した。LMF は第一産業株式会社より提供されたトンガ王国産モズクより調製されたものを使用した。実験ではアセト酢酸ナトリウム(3OB)をケトン体として使用した。糖代謝経路の阻害薬として、2-デオキシグルコース(2DG)、FCCP、オリゴマイシン A、ジクロロ酢酸を使用した。各細胞を播種後 24 時間前培養した後、LMF 及び 3OB を単独処理及び併用処理を 96 時間行い、細胞の呼吸活性及び細胞数の評価を行った。

[結果と考察]

LMF と 3OB の単独及び併用処理は HT1080 細胞、HCT116 細胞、および MDA-MB-231 細胞の増殖を抑制した。また糖代謝経路阻害剤と LMF の併用においては各細胞で増殖抑制効果の程度に違いが見られたため、がん細胞における Warburg 効果の強度が増殖抑制効果の違いとして現れたと考えられた。

fucoidan, anti-cancer, ketone body

講演番号：3B02p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B02 会場

リンゴおよびイシモズクによる細胞競合促進機構の解析

Mechanisms of apple- and Ishimozuku-mediated regulation of cell competition

○永長 一茂、中井 雄治（弘前大学）
○Kaz NAGAOSA, Yuji NAKAI (Hirosaki Univ.)

【背景と目的】

医療費の高騰が問題となっている昨今、効果的な医療費削減策が求められており、解決策のひとつが食による疾患予防である。医薬品と比べ予算面で制約の多い食品の機能性探索において、より安価かつ短期間で評価が可能な動物実験法の開発が求められている。これに答えるべく、私達はショウジョウバエを用い、細胞競合を指標としたがん予防食品の探索を行っている。細胞競合とは、性質の異なる二種類の細胞が隣接した際に一方の細胞が他方の細胞を取り除き、空きスペースを埋める現象を指す。2016 年度大会で、海藻のイシモズクが細胞競合を促進する、すなわちがん予防食品候補となることを報告した。本会では、リンゴからも同様の作用を見出したこと、両食品による細胞競合促進機構解明に向けた実験を行ったことを報告する。

【方法】

正常細胞とリボソームタンパク質遺伝子変異細胞（以下、変異細胞）が共存するショウジョウバエを作製した。細胞競合が起こると、変異細胞が除去されて正常細胞が増殖することになる。様々な粉末化食品を添加した飼料を調製して同動物を羽化直後から蛹化直前まで飼育した後、幼虫から摘出した翅原基（翅の元となる組織である）内の正常細胞の割合を測定した。遺伝子発現解析には半定量 RT-PCR を用いた。

【結果と考察】

リンゴ含有飼料で飼育したショウジョウバエでは、リンゴを与えなかった個体と比べ細胞競合が有意に促進された。よって、イシモズクに加えリンゴもがん予防食品候補とした。

細胞競合抑制因子には、アポトーシス細胞貪食受容体の Draper およびインテグリン βv がある。両分子の発現を抑えたショウジョウバエでは細胞競合が促進される。この動物にリンゴを与えても細胞競合のさらなる促進は見られなかったことから、リンゴの作用は貪食受容体による細胞競合制御の阻害であることがわかった。

アポトーシス細胞と接した細胞は自身の遺伝子発現様式を変化させる。その一部は貪食受容体依存であることが知られている。細胞競合で除去される細胞はアポトーシスを起こすことから、貪食受容体による細胞競合抑制は遺伝子発現変動を伴うことがと予想される。アポトーシス細胞と共培養した細胞で発現の増加する遺伝子群（JBC 292:8059）のうち、貪食受容体依存のものを半定量 PCR で選抜したところ、翅原基の発生に関わる転写調節因子 *X* が見出された。また、*X* の発現量は貪食受容体を欠くショウジョウバエでも低下していた。よって、細胞競合への X の抑制的な関与が示唆された。イシモズクを摂取したショウジョウバエでも *X* の発現は低下していたことから（2017 年度年会で報告）、同海藻による細胞競合促進は X を介する可能性が考えられた。

Drosophila, cell competition, engulfment receptor

発表責任者：永長一茂（knagaosa@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3B02p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B02 会場

がん抑制タンパク質 TSC2 のメチル化修飾による安定性への関与についての解析
Tumor suppresor protein TSC2 is stabilized thought its stability.

○玄 成秀、松本 雄宇、鈴木 司、小林 謙一、山本 祐司（東農大応生化）
○Seishu Gen, Yu Matsumoto, Tsukasa Suzuki, Ken-ichi Kobayashi, Yuji Yamamoto (Tokyo University of Agritulture)

細胞内のシグナルタンパク質は、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を受け、その機能が制御される。難病である結節性硬化症の原因タンパク質である TSC2 もまた、このシグナルタンパク質の１つとして知られており、翻訳後修飾によりその多様な機能が制御される。TSC2 は TSC1 と複合体を形成し細胞増殖を主る mTORC1 を負に制御する一方で、TSC2 の変異や欠損は過剰なタンパク質合成を促進し、細胞の腫瘍化を引き起こすことが報告されている。本研究では TSC2 内のメチル化サイトを検索したところ複数の候補を得たことから、TSC2 がメチル化修飾を受けるか、またこの修飾が TSC2 の機能にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。

初めに、TSC2 がメチル化修飾について、in vitro methylation assay を 3H-SAM・GST-TSC2 ペプチド・PRMTs を用いて解析した。その結果、in vitro において、TSC2 が PRMT1 によって直接メチル化されることが確認された。次に、TSC2 が細胞中でメチル化されるかメチル化抗体を用いて免疫沈降法にて解析した結果、TSC2 メチル化が確認された。更に、PRMT1 による TSC2 のメチル化の影響を確認する目的で、shPRMT1 を用い KD 細胞を作成したところ TSC2 発現の減少が見られた。また同様に、PRMT1 阻害剤を用いて解析した結果、TSC2 発現の減少が確認された。従って、TSC2 の安定化に PRMT1 によるメチル化が関与することが示された。次に、メチル基供与体である SAM およびメチオニンの影響を解析する目的で、メチオニン欠乏培地で 293T 細胞を培養し、TSC2 のタンパク質量を解析した。その結果、メチオニン欠乏時において TSC2 タンパク質の減少が確認された。また、SAM 合成酵素 MAT2 阻害剤添加においても、TSC2 タンパク質が減少していたことから、SAM を介して培地中のメチオニンが TSC2 の安定性に関与することが示された。最後に、脱メチル化 TSC2 のタンパク質分解にプロテアソーム分解系が関与するか否かについて検討した。その結果、プロテアソーム阻害剤添加時に脱メチル化による TSC2 タンパク質の分解が抑制されたことから、TSC2 が脱メチル化状態においてプロテオソーム系で分解されることを明らかにした。

本研究は結節性硬化症の原因タンパク質 TSC2 がメチル化を介して安定化するメカニズムの一端を明らかにした。特に、必須アミノ酸メチオニンが TSC2 の安定化に大きく関わっており、この TSC2 の安定化は PRMT1 による TSC2 のメチル化に起因することが考えられた。

TSC2, methylation, protein stabilization

発表責任者：玄　成秀（sgen0726@gmail.com）

講演番号：3B02p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B02 会場

エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響と食品ポリフェノールによるその緩和

Transgenerational effect of ethanol induced metabolic stress and its alleviation by dietary polyphenol

○安岡 顕人[1]、亀井 飛鳥[1]、篠崎 文夏[1]、嶋田 耕育[1]、野原 正勝[1]、飯尾 将太[1]、近藤 香[2]、岡田 晋治[3]、近藤 隆[2]、阿部 啓子[1,3]([1]地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所、[2]理化学研究所統合生命医科学研究センター、[3]東京大学大学院農学生命科学研究科機能性食品ゲノミクス)
○ Akihito YASUOKA[1], Asuka KAMEI[1], Fumika SHIONOZAKI[1], Kousuke SHIMADA[1], Masakatsu NOHARA[1], Shouta IIO[1], Kaori KONDO[2], Shinji OKADA[3], Takashi KONDO[2], Keiko ABE[1,3] ([1]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [2]RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, [3]ILSI Japan-Endowed Chair of Functional Food Science and Nutrigenomics Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

There are emerging evidences that support the existence of transgenerational impact caused by metabolic stresses such as fat over consumption. These metabolic stresses can be ameliorated by dietary polyphenols as functional food ingredients. We have found that co-administration of trans-resveratrol (RSV) can reduce alcoholic fatty liver in male mice, and that this improvement is dependent on a xenosensing nuclear receptor, CAR. The liver transcriptome analysis revealed that the process may include the regulation of key epigenetic metabolites such as folate, nicotineamide and methyl group donor. We then crossed these males with normal females, and examined metabolic phenotype of the offsprings. It was revealed that serum triacylglycerol level was higher in the offsprings from ethanol treated (E)-group than in those from control (C)-group, while it was unchanged in those from ethanol + RSV treated (ER)-group. The cluster analysis of the offsprings' liver transcriptome showed segregation between C- and E-groups but not between C- and ER-groups. To elucidate the underlying mechanism for this transgenerational alleviation by RSV, we analyzed genome-wide CpG methylation of the fathers' sperm and the offsprings' liver using methyl cytosine capture method and next generation sequencing. Interestingly, there were significant differences of methylated CpG distribution among C-, E- and ER- groups. In addition, part of these inter-group differences seemed to be inherited from the fathers' sperm to the offsprings' liver. We are now conducting sperm ChIP using antibody against histone marks to examine correlation between the epigenetic modifications of father's sperm and the transcriptional regulation in the next generation.

This work was supported by Council for Science, Technology and Innovation (CSTI), Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program (SIP).

metabolic stress, dietary polyphenol, epigenetics

講演番号：3B03a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B03 会場

プーアル・ウーロンミックス茶の摂取は肥満マウスの腸内細菌叢および脂質代謝を改善する
Pu-erh and oolong mixed tea improves gut microbiota and lipid metabolism in high-fat-induced obese mice

○板倉 彰吾[1]、荒谷 豪[1]、石村 友里[1]、下川 浩太[1]、山本 広晃[2]、小栗 武浩[2]、平井 静[1]、江頭 祐喜合[1]([1]千葉大院園芸、[2]アサヒ飲料（株））
○ Shogo ITAKURA[1], Takeshi ARAYA[1], Yuri ISHIMURA[1], Kouta SHIMOKAWA[1], Hiroaki YAMAMOTO[2], Takehiro Oguri[2], Shizuka HIRAI[1], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Asahi Soft Drinks Co.,Ltd.)

【目的】プーアル茶は中国では漢方薬のように飲まれており、抗肥満作用があることも報告されている。しかし、プーアル茶は微生物による発酵が行われることから独特の風味があり飲みにくいとされているため、日本ではそれほど浸透していない。そこで、ウーロン茶を混ぜることで飲みやすくなったプーアル・ウーロンミックス茶（ミックス茶）が開発された。先行研究において我々は、このミックス茶に脂質代謝改善作用があることを報告した。しかし、このミックス茶の脂質代謝改善作用のメカニズムについてはまだ明らかにされていない。そこで本研究ではミックス茶の持つ脂質代謝改善作用メカニズムとしてミックス茶が腸内細菌叢、胆汁酸吸着、膵臓リパーゼに与える影響を検討した。

【方法と結果】4 週齢 C57BL/6J マウスを使用し、1 週間の馴化後に標準食群、高脂肪食群、高脂肪食＋プーアル茶添加群、高脂肪食＋ウーロン茶添加群、高脂肪食＋プーアル・ウーロンミックス茶添加群の 5 群に分け、16 週間飼育を行った。飼育終了後に解剖を行った結果、ミックス茶添加によって内臓脂肪重量および血清中脂質の低下が認められた。また、飼育 16 週目におけるマウスの糞から DNA を抽出した後、16SrRNA の PCR 増幅、そしてシーケンサーを用いた配列決定を行い、腸内細菌叢を解析した。その結果、腸内細菌叢の門レベルでは高脂肪食摂取による Firmicutes 門細菌群の増加と Bacteroidetes 門細菌群の減少がミックス茶添加によって改善されていた。さらに、属レベル解析によってこれら門レベル細菌群の増減は主に Bacteroidetes 門である Bacteroides 属および Firmicutes 門である Lactpbacillus 属によるものであることが示唆された。

続いて、先行研究における血清中脂質の低下メカニズムとしてミックス茶の胆汁酸吸着能を評価したところ、ミックス茶が胆汁酸を吸着することで胆汁酸排出を促し、コレステロール代謝を改善する可能性が示された。また、ミックス茶のリパーゼ活性阻害を評価したところ、ミックス茶がリパーゼ活性を阻害することでトリグリセリドの分解を抑制し、トリグリセリドの吸収を抑制する可能性が示された。これらの結果から、先行研究で得られたミックス茶の持つ内臓脂肪重量の低下作用、脂質代謝改善作用は腸内細菌叢の改善、胆汁酸吸着またはリパーゼ活性阻害によって引き起こされることが示唆された。

tea, lipid metabolism, gut microbiota

発表責任者：江頭　祐喜合（egashira@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3B03a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B03 会場

昆布の食物繊維が食餌性肥満に及ぼす影響

The effect of dietary fiber included in Kombu on diet-induced obesity.

○高谷 直己[1]、紙谷 年昭[1]、戸田 登志也[1]、青江 誠一郎[2] ([1]フジッコ株式会社、[2]大妻女子大学)
○Naoki TAKATANI[1], Toshiaki KAMITANI[1], Toshiya TODA[1], Seiichirou AOE[2] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]Otsuma Women's Univ.)

【目的】昆布には乾重量あたり 30%もの食物繊維が含まれる（七訂日本標準食品成分表)。これまで昆布の生理作用についていくつかの研究例があるが、種類による食物繊維組成の違いが生理作用に及ぼす影響について調べられた例はない。そこで、本実験では 4 種の昆布（マコンブ, ガゴメコンブ, トロロコンブ, アツバコンブ）を用い、食物繊維組成の違いが食餌性肥満に与える影響について調べた。
【方法】マコンブ（2014 年産尾札部 1 等)、ガゴメコンブ（2009 年産椴法華 1 等)、トロロコンブ（2015 年産浜中 2 等)、アツバコンブ（2014 年産浜中 3 等）を、それぞれ 0.5 mm 以下に粉砕し試験に供した。昆布中の水溶性および不溶性食物繊維量は、MES-TRIS バッファーを用いた Prosky 変法（AOAC 公定法 991.43）によって求めた。アルギン酸量はアルカリ抽出後にカルバゾール硫酸法によって、ラミナラン量は硫酸加水分解後にグルコースオキシダーゼ法によって、フコイダン量は塩化セシルピリジニウム分画後にエタノール添加により生じた沈殿の重量から求めた。AIN-93G 組成を基本とした飼料にラードを配合した高脂肪食に、飼料あたり総食物繊維量が 5%となるように上記粉末を添加した。対照食にはセルロースを 5%添加した。 4 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを 7 日間普通食で予備飼育したのち、5 群（1 群 8 匹）に分けて 10 週間試験飼料を自由摂取させた。解剖は 6 時間絶食後にイソフルラン/CO_2 で安楽死後、肝臓、腹腔内脂肪、盲腸を摘出し、重量を測定した。血清脂質およびホルモンは酵素法および ELISA 法、肝臓脂質は Folch 法で抽出後、酵素法で分析した。
【結果および考察】昆布中の水溶性および不溶性食物繊維、アルギン酸、ラミナラン、フコイダンの含量は、乾重量あたりマコンブ（水溶性繊維, 不溶性繊維, アルギン酸, ラミナラン, フコイダン =7.1%, 23.9%, 30.4%, trace, 0.6%)、ガゴメコンブ（9.5%, 24%, 29.4%, trace, 0.7%)、トロロコンブ（15.9%, 29.3%, 29.9%, 6.3%, 1.3%)、アツバコンブ（20%, 20%, 24.8%, 10.4%, 1.1%）であり、 4 種で異なる食物繊維組成を有していた。全ての群間で摂餌量に差はなかった一方で、対照食群で観察された体重、腹腔内脂肪重量および血清レプチン濃度の増加は、昆布摂取によって有意に抑制された。また、内容物を含む盲腸重量は昆布摂取によって増加した。血清脂質濃度に明確な差は見られなかったが、肝臓トリグリセリド量は昆布摂取により有意に低値を示した。昆布摂取により観察されたこれら作用と水溶性食物繊維量との間に有意な相関が認められた。以上から、昆布摂取により食餌性肥満が抑制されること、その抑制作用の程度には、MES-TRIS バッファーで測定される水溶性食物繊維含量が強く影響する可能性が示唆された。

Soluble dietary fiber, Kombu, Anti-obesity

発表責任者：高谷　直己（n-takatani@fujicco.co.jp）

講演番号：3B03a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B03 会場

メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウスのコレステロール代謝に与える影響

The effect of a maple syrup extract on the cholesterol metabolism in obese type 2 diabetic model mice

○豊田 集[1,2]、石島 智子[1]、亀井 飛鳥[2]、阿部 啓子[1,2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]産技総研)
○Tsudoi TOYODA[1,2], Tomoko ISHIJIMA[1], Asuka KAMEI[2], Keiko ABE[1,2], Shinji OKADA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]KISTEC)

【背景】メープルシロップにはポリフェノールが豊富に含まれている。種々の溶媒を用いて得たポリフェノール抽出物について、糖質分解酵素の阻害活性や抗炎症活性が見出されており、血糖上昇の抑制やインスリン感受性の向上に役立つ食品素材としての利用が期待される。そこで、本研究では 2 型糖尿病モデルである KK-A^y マウスに対するメープルシロップのエタノールによるポリフェノール抽出物（MSx）の抗糖尿病作用について、血液生化学項目および肝臓の遺伝子発現変動から検討した。
【方法】4 週齢の雄の KK-A^y マウスに AIN-93G に準拠した餌（通常食）を与えて 4 日間馴化飼育した後、2 群に分けた（n=8/群）。Control 群には通常食を、MSx 群には通常食に MSx を 0.05%添加した MSx 食を 42 日間自由摂食させた。体重および摂餌量を 2 日に 1 回測定した。一晩絶食後に解剖を行い、血清および肝臓を採取した。血清中の総コレステロール、HDL コレステロールおよび LDL コレステロール濃度を測定した。肝臓から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析に供した。2 群間比較を行い、有意に発現変動する遺伝子群を抽出した。
【結果・考察】空腹時の血糖値に 2 群間で有意な差はなかったが、糖尿病で促進される動脈硬化の危険因子である LDL コレステロールの血清濃度は、MSx 群で有意に低値を示した。肝臓の網羅的遺伝子発現解析の結果、脂肪酸からコレステロールの合成経路にマップされる遺伝子群、およびコレステロールから胆汁酸の異化経路にマップされる遺伝子群は、MSx 群で発現上昇していた。この結果から、血清 LDL コレステロール濃度が低値を示した一因として、肝臓でコレステロールの合成を上回る異化が行われている可能性が考えられた。

maple syrup, cholesterol, DNA microarray

発表責任者：豊田集（t.26.toyoda@gmail.com）

講演番号：3B03a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B03 会場

ポモル酸の投与がラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

Gene expression analysis in the liver of rats administered pomolic acid

○井土 良一[1]、甲木 孝弘[1]、豊田 集[2,3]、石島 智子[2]、阿部 啓子[2,3]、岡田 晋治[2] ([1]（公財）東洋食品研究所、[2]東大院農生科・応生化、[3]産技総研)
○Ryoichi IZUCHI[1], Takahiro KATSUKI[1], Tsudoi TOYODA[2,3], Tomoko ISHIJIMA[2], Keiko ABE[2,3], Shinji OKADA[2] ([1]Toyo institute of food technology, [2]Tokyo Univ., [3]KISTEC)

【背景・目的】3T3-L1 由来脂肪細胞に対して脂肪蓄積を抑制する成分をカキ果皮から探索し、トリテルペノイド類のポモル酸を見出した。そこで、投与されたポモル酸が高脂肪・高コレステロール・高フルクトース食負荷を与えたラット肝臓の脂質代謝に影響するかを DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析で調査した。
【実験方法】5 週齢オスのWistar 系ラットを 1 週間の馴化飼育後に 2 群に分けて(n=7/群)、高脂肪(41 kcal%)・高コレステロール(2 gm%)・高フルクトース(30 gm%)(HFC)飼料(CD 群)、又は 0.01%($^{w}/_{w}$)ポモル酸を添加した HFC 飼料(PD 群)を 10 週間自由摂取させた。試験終了時に 2 時間絶食して麻酔下で大腿動脈から放血後、肝臓を摘出した。遺伝子発現解析には各群からそれぞれ 5 検体を選抜して肝臓から total RNA を抽出し、Clariom™ S Assay, Rat (Thermo Fisher Scientific)を使った DNA マイクロアレイ解析を実施した。データの正規化には qFARMS 法、2 群比較には rank products 法（FDR < 0.05）を用いた。抽出された発現変動遺伝子群について pathway 解析を行った。
【結果と考察】肝臓の発現変動遺伝子を pathway 解析した結果、発現増加遺伝子は‘glycerolipid metabolism’、‘fatty acid metabolism’、‘biosynthesis of unsaturated fatty acid’、 ‘PPAR signaling pathway’、‘AMPK signaling pathway’、‘oxidative phosphorylation’に関連しており、脂肪酸の生成、ベータ酸化に関わる遺伝子や ATP 生産に関わる遺伝子を含んでいた。発現減少遺伝子は、‘MAPK signaling pathway’、‘FoxO signaling pathway’、‘p53 signaling pathway’、‘Toll-like receptor signaling pathway’などに関連しており、*Rela*、*Tp53*、*Jun* など炎症、細胞増殖、アポトーシスに関連する遺伝子を含んでいた。これら pathway 解析の結果から、摂取されたポモル酸は脂肪の消費によるエネルギー生産の亢進と、炎症の抑制につながる遺伝子発現を誘導すると考えられた。

pomolic acid, triterpene, gene expression

発表責任者：井土良一（ryouichi_izuchi@shokuken.or.jp）

講演番号：3B03a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B03 会場

バラ花弁中のポリフェノールである Eugeniin はヒト肝細胞における LDL 受容体活性化に関与する
Eugeniin, a polyphenol in rose petals, is participate in activation of LDL receptor in human hepatocyte.

○川口 勇矢[1]、岡田 健司[2]、岡田 利孝[3]、長岡 利[1,2]（[1]岐阜大自然科学、[2]岐阜大応用生物、[3]（株）東洋発酵）
○Yuya KAWAGUCHI[1], Kenji OKADA[2], Toshitaka OKADA[3], Satoshi NAGAOKA[1,2] ([1]Gifu Univ. Nat. Sci. Tech., [2]Gifu Univ. Appl. Biol.Sci., [3]TOYO HAKKO Co., Ltd.)

【目的】
ポリフェノールは植物体に含まれる様々な生体調節機能を示す食品成分であり，我々の健康維持・向上に寄与することが期待されている。ROSE CRYSTA®-70 はバラ花びらエキスから抽出されたポリフェノールを濃縮した機能性素材であり，肌の老化防止や脂肪吸収抑制，食後の血糖値上昇抑制，抗酸化活性が報告されているが，脂質代謝における改善作用の詳細は明らかになっていない。特に，バラ花びらに含まれるポリフェノールは多様な成分から構成されており，脂質代謝改善作用を発揮する有効成分は未だ不明である。そこで，本研究ではヒト培養肝細胞 HepG2 を用いて ROSE CRYSTA®-70 およびバラ花びらに含まれるポリフェノールの 1 つである Eugeniin の脂質代謝に対する影響を検討した。
【方法・結果】
〈実験 1〉【A】Control 群，ROSE CRYSTA®-70 群(1.0，5.0，10，25，50 μg/mL)を用いて実験を行った。各群を HepG2 細胞に 24 時間処理した後，WST-1 法によって細胞増殖への影響を測定した。【B】Control 群，ROSE CRYSTA®-70 群(1.0，2.5，5.0 μg/mL)を HepG2 細胞に 24 時間処理した後，RT-PCR によって LDLR，SREBP2，ACC1，ACC2，FAS，ACOX，CPT1a，SREBP1c などの mRNA レベルを測定した。〈実験 2〉【A】Control 群，Eugeniin 群(1.0，5.0，10，25，50 μM)を用いて実験を行った。各群を HepG2 細胞に 24 時間処理した後，WST-1 法によって細胞増殖への影響を測定した。また，Control 群，Eugeniin 群(5.0 μM)を HepG2 細胞に 24 時間処理した後，【B】RT-PCR によって LDLR，ACC1，ACOX，CPT1a，SREBP1c などの mRNA レベルを、【C】ウエスタンブロットによって LDLR のタンパク質レベルを測定した。
その結果，〈実験 1〉【A】10 μg/mL 以上の添加で細胞増殖量が有意に減少した。【B】LDLR，ACOX，CPT1a の mRNA レベル有意に増加し，ACC1，SREBP1c の mRNA レベルが有意に減少した。〈実験 2〉【A】25 μM 以上の添加で細胞増殖量が有意に減少した。【B】LDLR，CPT1a の mRNA レベルが有意に増加し，SREBP1c の mRNA レベルが有意に減少した。【C】LDLR のタンパク質レベルが有意に増加した。
以上の結果から，ROSE CRYSTA®-70（バラ花びらエキスから抽出されたポリフェノール）に含まれる脂質代謝改善作用を発揮する有効成分の一つは，従来，脂質代謝改善作用に関する報告がない Eugeniin であり，Eugeniin は脂質代謝改善作用を発揮する新規ポリフェノールであることを発見した。

Eugeniin, LDLR, Rose polyphenol

発表責任者：長岡 利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B03a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B03 会場

脱脂したマアジがラットに及ぼす影響

Effect of feeding defatted horse mackerel on lipid metabolism in rats

○原口 翼[1]、土橋 葵[1]、水田 成美[1]、木村 このみ[1]、多田 早織[1]、馬場 郁香[1]、桑原 浩一[2]、田中 一成[1] ([1]長崎県大、[2]長崎県総合水試)
○Tsubasa Haraguchi[1], Aoi Tsuchihashi[1], Narumi Mizuta[1], Konomi Kimura[1], Saori Tada[1], Fumika Baba[1], Koichi Kuwahara[2], Kazunari Tanaka[1] ([1]Univ. Nagasaki, [2]Nagasaki Pref. Fisheries Exp. Sta.)

【目的】長崎県では水産業が盛んで、魚肉練り製品の製造も活発に行われており、多様な魚種を利用した製造技術を開発し、マアジも利用されている。練り製品の製造工程で行われる水晒しは魚の油や血を除去するために行われ、脂質以外の成分が製造に用いられる。マアジの脂質以外の成分の機能性についてはほとんど知られていない。そこで本研究では、マアジの脂質以外の成分がラットの脂質代謝に及ぼす影響について検討した。
【方法】マアジは長崎県近海で水揚げされたものを使用した。試料はマアジ落とし身をヘキサンおよびエタノールで脱脂したものを凍結乾燥し、粉末状にしたものを用いた。マアジおよび脱脂マアジのたんぱく質含量はそれぞれ 63.9%、85.3%、脂質含量は 28.6%、0.5%であった。AIN-93G 組成に基づき、コレステロール(Chol)0.1%添加したものをコントロール(CO)食とした。マアジおよび脱脂マアジ凍結乾燥粉末を CO 食のたんぱく質レベル 15%と置き換え、脂質含量を大豆油で 7%にし、Chol を 0.1%に調節したものをそれぞれマアジ食および脱脂マアジ食とした。これらの飼料を SD 系雄ラットに 4 週間自由摂食させた後、6 時間絶食後解剖し、血清および肝臓脂質濃度、肝臓脂肪合成関連酵素活性、糞中脂肪酸およびステロイド排泄量を測定した。
【結果・考察】摂食量および体重増加量に群間で差は認められなかった。血清 Chol およびリン脂質(PL)濃度はマアジ群で CO 群と比較して有意に低かったが、脱脂マアジ群の値は CO 群とマアジ群との中間であった。血清遊離脂肪酸濃度は CO 群に対してマアジ群で有意に低値を示し、脱脂マアジ群で低い傾向を示した。血清トリグリセリド(TG)およびグルコース濃度にすべての群間において差は認められなかった。マアジおよび脱脂マアジ食を摂食したラットにおいて肝臓 Chol および PL 濃度は CO 食と比較して有意に低値であった。肝臓 TG 濃度はマアジ群で CO 群と比べ低い傾向を示したが、脱脂マアジ群で差は認められなかった。肝臓脂肪合成酵素活性は CO 群と比較してマアジ群で有意に低い値を示し、脱脂マアジ群では CO 群とマアジ群との間の値であった。一方、肝臓脂肪酸分解酵素活性はマアジ食の摂食により CO 食よりも有意に高値であったが、脱脂マアジ食では CO 食とマアジ食の中間の値であった。糞中脂肪酸排泄量はマアジ群で CO 群に対して有意に高値を示したが、脱脂マアジ群と CO 群との差異はなかった。以上の結果より、マアジの脂質以外の成分はマアジそのものよりも弱いものの脂質低下作用を有し、練り製品などの機能性食品の素材としての有用性が明らかになった。

lipid metabolism, defatted fish, fish cake

講演番号：3B03a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B03 会場

必須脂肪酸欠乏時のミード酸産生の阻害による肝脂肪蓄積の制御機構
Regulation of hepatic lipid accumulation in inhibition of Mead acid synthesis in an essential fatty acid deficiency state

○市 育代[1]、島村 彩乃[2]、林 優里[2]、満留 悠[2]、藤原 葉子[1]([1]お茶大基幹研究院、[2]お茶大院・ライフサイエンス)
○Ikuyo ICHI[1], Alan SHIMAMURA[2], Yuri HAYASHI[2], Haruka MISTUDOME[2], Yoko FUJIWARA[1]
([1]Ochanomizu Univ., [2]Life, Ochanomizu Univ.)

【目的】哺乳動物において必須脂肪酸が欠乏すると、生体内に存在するオレイン酸（C18:1n-9）から通常は存在しないミード酸（C20:3n-9）が産生される。我々は以前、オレイン酸からミード酸の産生が、n-6 系脂肪酸のリノール酸からアラキドン酸、n-3 系脂肪酸のα-リノレン酸から EPA と同様の遺伝子で行われることを明らかにしている（BBA, 2014)。必須脂肪酸欠乏時に代替的に産生されるミード酸は欠乏を補う生理活性を有する可能性が考えられるが、ミード酸が産生される意義および制御機構は不明である。Fatty acid desaturase 2（Fads2）はミード酸産生の最初の不飽和化を担う酵素である。ミード酸のような高度不飽和脂肪酸（炭素 20 以上、二重結合 3 つ以上）は必須脂肪酸欠乏時に肝臓でも顕著に増加することから、本研究では Fads2 阻害によるミード酸の産生抑制が肝臓に及ぼす影響を調べた。
【方法】8 週令の雄 C57BL/6J マウスを用いて、Control 群は 7%の大豆油食を、必須脂肪酸欠乏（EFAD）群は 7%のトリパルミチン（TAG-16:0）を含む EFAD 食をそれぞれ 12 日間与えた。EFAD 群はそのまま必須脂肪酸欠乏食を与える EFAD 群と Fads2 阻害剤 SC-26196（50 mg/kg 体重/日）を与える EFAD+SC 群に分けて、3 週間飼育を行い、Control 群も同様に 3 週間飼育を行った。
【結果】EFAD+SC 群では肝臓や血漿においてミード酸が著しく減少し、18:1n-9 や 20:1n-9 などのミード酸の前駆物質が増加していたことから、SC26196 投与によってミード酸産生が阻害されていることが確認できた。肝臓の HE 染色と Oil red O 染色の結果、EFAD 群でも脂肪蓄積はみられたが、EFAD+SC 群の方が脂肪蓄積は顕著であった。また、肝臓の中性脂肪量も EFAD+SC 群では Control 群に比べて有意に増加した。さらに、EFAD+SC 群では血漿の中性脂肪量は減少傾向にあったことから、VLDL 分泌に関わる血漿のホスファチジルコリン（PC）と apoB を調べたところ、EFAD+SC 群ではこれらの値が有意に減少しており、必須脂肪酸欠乏時の Fads2 阻害が VLDL 分泌を減少させることが示された。最近、高度不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の肝臓 PC における減少が VLDL 分泌を阻害することが報告されている（eLIFE, 2015)。本研究において、EFAD 群の肝臓 PC はミード酸が著しく増加しており、その結果、アラキドン酸が減少しているにも関わらず、PC の高度不飽和脂肪酸の総量は Control 群と変わらなかった。一方、EFAD+SC 群は EFAD 群に比べ、肝臓及び血漿 PC のミード酸は顕著に減少しており、PC における高度不飽和脂肪酸の総量も Control の半分程度であった。これらの結果より、必須脂肪酸欠乏時の肝臓におけるミード酸の減少は VLDL 分泌に対して抑制的に作用することが示唆された。

fatty acid, hepatic steatosis, phospholipid

発表責任者：市　育代（ichi.ikuyo@ocha.ac.jp）

講演番号：3B03a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B03 会場

高ショ糖食誘発性脂肪肝モデルラットにおける果実果皮に含まれる機能性化合物の同定と作用機構の解析

The identification and analysis of functional ingredients in peel extracts on hepatic steatosis induced by high-sucrose diet in rats

○鈴木 絢子[1]、宮島 詩織[2]、信岡 かおる[1,2]、梅木 美樹[4]、望月 聡[3]、石川 雄一[1,2]（[1]大分大理工、[2]大分大院工、[3]大分大教育、[4]別府大食物栄養）
○ Ayako SUZUKI[1], Shiori MIYAJIMA[2], Kaoru NOBUOKA[1,2], Miki UMEKI[4], Satoshi MOCHIZUKI[3], Yuichi ISHIKAWA[1,2] ([1]Sci. Technol., Oita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Oita Univ., [3]Edu., Oita Univ., [4]Dep. Food and Nutr., Beppu Univ.)

【目的】我々は、果実果皮中の保健機能性成分の探索と作用機構の解明をすすめてきた。これまでの研究で、完熟ユズ果皮のエタノール抽出物中には、ポリフェノールやフラボノイド類が豊富に含まれており、ユズ果皮中のクマリン誘導体オーラプテンが亢進したⅠ型アレルギー指標値の低減作用を持つことを見出した。一方、西洋ナシの果皮においても、同様の抗炎症作用をもつ新たな化合物が報告されている(Christells M. Andre *et. al,* 2013)。そこで、ユズ及びナシの果皮に含まれる新たな機能性化合物に着目した。近年、糖質の過剰摂取などの食生活習慣が原因で引き起こされる非アルコール性脂肪性肝疾患の患者数が世界的に増加していることから、本研究では、高ショ糖食誘発性脂肪肝に焦点を当て、ラットを用いてユズとナシの果皮抽出物の効果を検討し、機能性化合物を同定するとともに、その作用機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

【方法】乾燥した完熟ユズ果皮粉末およびナシ果皮粉末を、95%エタノールで加熱還流抽出し、エタノールを除去した果皮抽出物を得た。5 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、飼料中の炭水化物をすべてショ糖とした高ショ糖食と、高ショ糖食にユズおよびナシ果皮抽出物を 1%および 2%添加した飼料を試験群として 7 日間自由摂取させた。飼育最終日に血清、肝臓を採取して脂質の分析を行った。有意な効果が見られた成分について、細分化して同様の検討・分析を行った。

【結果】高ショ糖食群では肝臓脂質の増加が認められ、それに対してナシ果皮抽出物を添加した群では肝臓脂質の弱いながら減少が見られた。一方、ユズ果皮抽出物を添加した群では肝臓脂質の有意な低下が見られたことから、ユズ果皮中に高ショ糖食誘発性脂肪肝を抑制する機能性成分が含まれていることが示唆された。ユズ果皮抽出物をさらに分画して段階的に検討を行った結果、細分化した水溶出画分の投与によって肝臓脂質が有意に減少した。GC-MS/MS 分析により同定した水溶出画分含有化合物のうち、糖および糖アルコール類に着目してさらに検討を行ったところ、ユズ果皮中の脂肪肝抑制作用を持つ機能性化合物の一つとして myo-イノシトールを同定した。現在、メタボローム解析により作用機構を検討している。

hepatic steatosis, citrus-yuzu peel extract, functional ingredients

講演番号：3B03a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B03 会場

ユズ果皮エタノール抽出物がクロレトン誘発脂肪性肝疾患モデルラットに与える影響

Effects of ethanol extract from citrus-yuzu peel on hepatic steatosis induced by chloretone

○平川 えりか[1]、鈴木 絢子[2]、信岡 かおる[2]、望月 聡[3]、石川 雄一[2] ([1]大分大工、[2]大分大理工、[3]大分大教育)
○ Erika HIRAKAWA[1], Ayako SUZUKI[2], Kaoru NOBUOKA[2], Satoshi MOCHIZUKI[3], Yuichi ISHIKAWA[2] ([1]Eng., Oita Univ., [2]Sci. Technol., Oita Univ., [3]Edu., Oita Univ.)

【目的】我々は、高ショ糖食誘発性脂肪肝モデルラットを用いた研究においてユズ果皮エタノール抽出物が脂肪肝抑制作用を示すことを明らかにし、その抑制成分の 1 つとして myo-イノシトールを同定した。しかしユズ果皮エタノール抽出物中に未だ見出せていない機能性成分が含まれていると考えている。脂肪肝の発症には様々な要因があり、生体異物による代謝変動によっても脂肪肝やさらに進行した状態である肝炎を引き起こす。そこで本研究では、先の報告で用いた高ショ糖食誘発モデルではなく、生体異物誘発性肝疾患モデルを用いることで、ユズ果皮エタノール抽出物中に含まれる非アルコール性脂肪性肝疾患を低減、抑制する新たな機能性化合物を探索することを目的とした。
【方法】ラットに生体異物の 1 つであるクロレトン (1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol)を摂取させることで、脂肪肝、肝炎、高コレステロール血症を誘発できるという報告がある。そこで 5 週齢の Wistar 系雄性ラットにクロレトンを添加した飼料と、これにユズ果皮エタノール抽出物を 1%または 2%添加した飼料を試験群として、14 日間自由摂取させた。飼育最終日に血液と肝臓を採取し、血清生化学検査と脂質の分析を行った。次にユズ果皮エタノール抽出物を性質ごとに分画したものを飼料に添加して与え、同様の検討を行った。
【結果】クロレトンを投与したラットでは肝疾患指標値である血清 ALT の上昇、肝臓脂質の増加等が見られた。このことから、クロレトンの投与は脂肪肝・肝炎モデルとして用いることができることを確認した。ユズ果皮エタノール抽出物をクロレトンと同時摂食させることで、肝臓脂質および血清 ALT 値が有意に低下した。また、2%添加した群の方がより強い肝臓脂質低下作用を示し、用量依存的に効果を示すことがわかった。ユズ果皮エタノール抽出物を分画したところ約 85～90wt%が水溶性画分、約 2～10wt%が親油性画分であった。2%抽出物相当の水溶性画分添加飼料の投与により肝臓脂質の低下作用が認められた。一方 2%抽出物相当量の親油性画分においては、水溶性画分の 1/10 程度の量にも関わらず肝臓脂質低下作用を示したことから、親油性画分に着目し用量依存的効果を検討した。その結果、2%抽出物中の 5～10 倍量の親油性画分の投与によって肝臓脂質が有意に低下した。これらの結果から、親油性成分にも機能性化合物が含まれていることが示唆された。今回クロレトン添加食の投与に対して効果を示した物質は高ショ糖食誘発脂肪肝に対して効果を示した myo-イノシトールとは異なる新しい機能性化合物であると考えられる。現在、さらに画分を細分化して機能性化合物の同定を進めている。

hepatic steatosis, citrus-yuzu peel extract, functional ingredients

講演番号：3B03a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B03 会場

モリンガの体脂肪低減効果の検証
Effects of *Moringa oleifera* on improvement of lipid metabolism.
○吉沼 春香[1]、平澤 康史[2]、田中 充[1]、松尾 伸二[1]、田辺 創一[1]、仲村 太志[1]([1]日清食品ホールディングス（株）・グローバルイノベーション研究センター、[2]（株）日本バイオリサーチセンター・試験部)
○Haruka YOSHINUMA[1], Yasushi HIRASAWA[2], Mitsuru TANAKA[1], Shinji MATSUO[1], Soichi TANABE[1], Futoshi NAKAMURA[1] ([1]Nissin Foods Holdings Co., Ltd Nissin Global Innovation Center, [2]Nihon Bioresearch Inc. Study Department)

【目的】
日本では男性の 31.3%、女性の 20.6%が肥満症に該当する（平成 28 年国民健康・栄養調査)。肥満は生活習慣病の原因となることから、その改善は急務である。そこで、3T3-L1 細胞を用い、脂肪蓄積抑制効果がある食品素材のスクリーニングを行った。また、選抜したモリンガ（学名：*Moringa oleifera*）について、肥満モデルマウスを用いて、体脂肪低減効果について検証した。
【方法】
（in vitro 試験）
植物素材を中心に 130 種の食品素材についてエタノール、水等にて抽出物を作製した。3T3-L1 前駆脂肪細胞を増殖培地で 4 日間培養後、各種抽出物を添加した分化誘導培地にて 3 日間培養した。維持培地に交換後 6 日間培養し、細胞内脂肪蓄積量を Oil Red 染色により評価した。
（in vivo 試験）
C57BL/6J マウス（♂、5 週齢）を用い 7 日間馴化後、被験サンプル（モリンガ葉、大麦若葉）を 57 日間高脂肪食に混餌投与した。体重、摂餌量、脂肪重量（後腹膜脂肪、精巣周囲脂肪、腹部皮下脂肪、腸間膜脂肪、総脂肪)、血中中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロールを測定した。なお、本試験は株式会社日本バイオリサーチセンターにて実施した。
【結果】
（in vitro 試験）
評価した 130 種の食品素材の中で、モリンガのエタノール抽出物が高い脂肪蓄積抑制作用を示した。
（in vivo 試験）
モリンガ群ではコントロール群と比較して総脂肪重量が有意に減少した（モリンガ群 3.3 ± 0.3 g、コントロール群 4.5 ± 0.2 g、p=0.033)。また、HDL コレステロールがモリンガ群でコントロール群と比較して有意に高値を示した(モリンガ群 86.7 ± 1.4 mg/dl、コントロール群 70.0 ± 5.2 mg/dl、p=0.004)。一方、大麦若葉群では総脂肪重量に有意な差は確認されなかった。モリンガは栄養価の高さから注目されている植物素材である。現在、ヒトでの有効性、有効成分およびメカニズムについて検討中であり、今後明らかにしていく予定である。

Moringa oleifera, lipid metabolism

発表責任者：仲村　太志（futoshi.nakamura@nissin.com）

講演番号：3B03a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B03 会場

モリンガ葉抽出物による脂肪肝予防効果

Prophylactic effect of moringa leaf extract on hepatic steatosis

○伊井野 貴史、中村 唱乃、庄屋 雄二、坂下 真耶、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○ Takashi Iino, Utano Nakamura, Yuji Shoya, Maya Sakashita, Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
モリンガ（*Moringa oreifela*）は成長がきわめて早く、アミノ酸やミネラル・タンパク質が豊富で、様々な機能性を有する。我々はモリンガがヒトの健康長寿に寄与できる可能性に注目し、様々な方面から生理機能の探索を行っている。昨年度の大会においては、モリンガ葉のエタノール抽出物(MOR-EX)が脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす効果について報告した。今回は、MOR-EX が脂肪肝予防効果を有することを見出したので報告する。

【方法】
インビトロ脂肪肝モデルによる評価　ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に脂肪酸化 BSA(FA-BSA)を取り込ませることによりインビトロ脂肪肝モデルを作成した。この脂肪肝モデルにおいて、FA-BSA を取り込ませるのと同時に、または FA-BSA を取り込ませたあとに MOR-EX を添加し、形成された脂肪滴を Oil Red O で染色し、染色された脂肪滴を抽出・定量した。
高脂肪食摂取マウスによる評価　C57BL/6J マウス♂に、①普通食、②高脂肪食、③高脂肪食＋5% MOR-EX を 12 週間摂取させた。マウスを解剖、肝臓と脂肪組織を摘出し、肝臓重量を測定後、肝臓と脂肪組織から RNA を抽出、cDNA を合成し、RT-PCR にて脂質代謝関連遺伝子の発現を解析した。

【結果・考察】
インビトロ脂肪肝モデルによる評価　FA-BSA を取り込ませるのと同時に MOR-EX を添加したところ、濃度依存的な脂肪滴の形成抑制効果が認められ、MOR-EX の脂肪肝予防効果が示された。また、FA-BSA を取り込ませて脂肪滴を形成させたあとに MOR-EX を添加しても濃度依存的な抑制効果が認められ、MOR-EX の脂肪肝治療効果が示された。
高脂肪食摂取マウスによる評価　②高脂肪食を 12 週間摂取させると、①普通食を摂取させた場合に比べ約 20%肝臓重量が増加した。一方、③高脂肪食＋5% MOR-EX を摂取させると、①普通食を摂取させた場合と同レベルまで肝臓重量の増加は抑制された。遺伝子発現解析を行ったところ、肝臓では Sirt１の発現が①普通食摂取なみに回復し、ATGL、PPAR-α、PPAR-γ の発現が②高脂肪食摂取に対して増加していた。脂肪組織ではアディポネクチンの発現が①普通食摂取なみに回復し、UCP-3 の発現が②高脂肪食摂取に対して増加していた。以上の結果より、モリンガ葉のエタノール抽出物(MOR-EX)は脂肪肝予防効果を有する機能性食品素材として有用であると考えられる。

moringa, lipid metabolism, steatosis

講演番号：3B03a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B03 会場

モリンガ葉抽出物からの脂質代謝活性成分の同定
Identification of the active ingredient of lipid metabolism in *Moringa oleifera* extract
○久留宮 綾人、林 英雄、森田 沙代、中村 唱乃、坂下 真耶、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Ayato Kurumiya, Hideo Hayashi, Sayo Morita, Utano Nakamura, Maya Sakashita, Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【背景・目的】
モリンガ（*Moringa oleifera*）はアブラナ目ワサビノキ科の落葉樹で、干ばつに強く、熱帯・亜熱帯地域で広く栽培されている。我々は、モリンガの成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与すると考え、モリンガ葉エタノール抽出物（MOR-EX）から様々な生理機能を探索した。その結果、MOR-EX が脂質代謝関連遺伝子の発現に影響することを発見した（2017 年本大会で発表）。その中でも、ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞を用いた FGF21(fibroblast growth factor 21)遺伝子の発現量に大きな変化が見られた。そこで、HepG2 細胞中の FGF-21 発現量を指標として、MOR-EX から活性物質の単離および構造解析を行ったので、ここに報告する。
【方法】
モリンガ葉粉末をエタノールで抽出し、濃縮後、再度水に溶解し、酢酸エチルを用いて抽出した。得られた酢酸エチル抽出物を、シリカゲルカラムを用いてヘキサン、酢酸エチル、メタノールで順次溶出した。その後、得られた画分を、同様に各濃度の上記有機溶媒でさらに溶出・分画を行い、遺伝子発現試験による活性評価を行った。遺伝子発現試験に関しては、HepG2 細胞を 24 ウェル培養プレートに播種し、24 時間血清飢餓後、DMSO に溶解した分画物を添加した。4 時間インキュベート後、全 RNA を抽出、cDNA を合成し、Real-time PCR 法にて β アクチン mRNA の発現量に対する FGF21 遺伝子 mRNA の発現量の割合を定量した。分画物を、ODS カラム（YMC-PACK ODS-A）を用いて、移動相をアセトニトリル（5%から 70%の濃度勾配）とし、高速液体クロマトグラフィーにより精製・単離を行った。その後、最終単離物は NMR を用いて構造解析を行った。
【結果・考察】
活性物質の構造は、いずれもベンジル類イソチオシアネートであった。我々は、MOR-EX から単離したベンジル類イソチオシアネートが、FGF21 遺伝子の発現量を有意に増加させることを明らかにした。今後は、各種物質の活性を比較するとともに、それらが脂質代謝に及ぼすメカニズムについて調べる。

moringa, lipid metabolism

講演番号：3B03a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B03 会場

中鎖脂肪酸がマウスの肥満に及ぼす影響

Effects of medium-chain fatty acids on obesity in mice

○米津 瞳[1]、増澤（尾﨑） 依[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]（[1]日大・生資科・生命化、[2]日大院・生資科・応生科）
○Hitomi Yonetsu[1], Yori Ozaki-Masuzawa[1], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】食生活や運動不足によって引き起こされる肥満は、心筋梗塞や脳卒中などの重篤な生活習慣病の原因と考えられている。日本の肥満人口は食生活の欧米化やライフスタイルの変化により増加傾向にある。これは、食生活の多様化により動物性脂質の摂食量が増加し、ラードや牛脂に多く含まれている Long-chain triglyceride（LCT）の摂取が増えたためと考えられている。Long-chain fatty acids（LCFA）は炭素数 12 以上の脂肪酸であり、LCT を構成する脂肪酸である。一方、Medium-chain fatty acids（MCFA）は炭素数 8 ~10 の脂肪酸で、ココナッツオイルやパーム油に多く含まれる。MCFA を多く含む Medium-chain triglyceride（MCT）は LCT よりも短時間で代謝されることから、手術後や未熟児のエネルギー補給などの医療現場においても利用されている。さらに、MCT 含有食摂餌は体脂肪率や血中コレステロール濃度を抑制することも報告されている。しかし、MCT が体脂肪率や血中コレステロール濃度を抑制するメカニズムに関しては不明な点が多い。本研究では LCT 含有高脂肪食と MCT 含有高脂肪食がマウスの食事誘導性肥満に及ぼす影響と LCFA, MCFA の代謝関係を明らかにすることを目的として、基礎的な検討を行った。
【方法】C57BL/6J マウスに LCT（C16:0, 23%; C18:0, 19%; C18:1, 45%; C18:2, 13%）含有高脂肪食（以下 LCT）、または MCT（C8:0, 3%; C10:0, 97%）含有高脂肪食（以下 MCT）を 8 週間自由に摂食させた。体重、摂餌量は一週に 1 回測定し、飼育開始 7 週目に経口糖負荷試験を実施した。また、MCT、LCT 摂餌マウスの呼吸代謝について、エネルギー代謝測定装置（Oxymax 等流量システム、コロンバス社）による呼気ガス分析により検討した。実験終了時に回収した肝臓、血漿について qPCR 法による脂肪酸合成関連因子 mRNA の測定、薄層クロマトグラフィーと GC-MS を用いて血漿遊離脂肪酸組成の分析を行った。
【結果】8 週間の MCT 摂餌は、LCT 摂餌と比較し、体重、白色脂肪組織重量の増加を抑制し、耐糖能の異常も軽度であった。呼気ガス分析の結果、MCT 摂餌マウスの VCO_2（二酸化炭素排出量）は、LCT 摂餌マウスより高値を示した。一方、脂肪酸合成酵素（FAS）の mRNA は LCT 含摂餌マウスと比較し MCT 摂餌マウスで低値を示した。現在、血漿遊離脂肪酸の分析を行っている。
【結論】MCT は LCT と比較し、脂質酸化の促進、FAS 活性の低下を介して抗肥満作用を示す可能性が明らかとなった。

Medium-chain fatty acid, Obesity, Lipid Metabolism

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B03a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B03 会場

更年期に伴う脂質代謝変動に対する共役リノール酸と大豆サポニンの併用摂取効果

Combined intake effects of conjugated linoleic acid and soybean saponin on modulation of lipid metabolism associated with menopause

○谷澤 郁[1]、鈴木 那菜[1]、長田 恭一[1]、戸田 登志也[2] ([1]明治大農、[2]株式会社フジッコ)
○Kaoru TANIZAWA[1], Nana SUZUKI[1], Kyoichi OSADA[1], Toshiya TODA[2] ([1]Meiji Univ., [2]Fujicco Co., Ltd.)

●背景

更年期の女性は、卵巣機能低下による女性ホルモンの欠乏に伴い、脂質代謝異常をはじめとした種々の症状を発症する。本研究では、脂質代謝異常を予防または改善する機能性成分として共役リノール酸（CLA）と大豆サポニン高含有画分（SAPF）に注目し、2 成分を卵巣摘出した更年期モデルラットに単独あるいは同時に摂取させた場合の脂質代謝変動に対する効果を検討した。

●方法

4 週齢の Wistar 系雌性ラットの卵巣を摘出し、対照群は偽手術を施した。偽手術ラットには AIN93 純化飼料（SHAM 群）を、卵巣摘出ラットには純化飼料（OVX 群）、純化飼料に 1% CLA を添加した飼料（CLA 群）、0.1% SAPF を添加した飼料（SAPF 群）、あるいは 1% CLA と 0.1% SAPF を添加した飼料（INT 群）をペアフィーディング条件で給餌した。55 日間飼育し、12 時間の絶食後、腹部動脈より採血死させ、種々の組織を採取して脂質代謝に関わる種々のパラメータを測定した。

●結果と考察

卵巣の摘出により、体重増加量や脂質パラメータに変動が生じたが、CLA の摂取により内臓脂肪重量の増加が抑えられ、SAPF との併用摂取でより強い抑制効果が認められた。肝臓トリグリセリド（TG）濃度は CLA の摂取で、肝臓コレステロール（Chol）濃度は CLA 及び SAPF の摂取で改善され、後者では併用摂取による相加的な改善効果が認められた。血漿 Chol 濃度は SAPF の摂取で改善され、併用摂取した場合により強い改善効果が得られた。以上のことから、CLA と SAPF を摂取することで卵巣機能低下に伴う脂質代謝変動が調節され、2 成分の併用摂取でより強い効果が得られると考えられた。以前の研究結果をふまえると、精製した大豆イソフラボンよりも、サポニン等を含むイソフラボン高含有試料と CLA との併用摂取が更年期脂質代謝調節に効果的であると考えられた。

menopause, conjugated linoleic acid, saponin

講演番号：3B03p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B03 会場

乳酸菌が産生する希少脂肪酸のペルオキシソームにおける代謝
Peroxisomal metabolism of rare fatty acids produced by *Lactobacillus*

○森戸 克弥[1]、清水 良多[1]、北村 苗穂子[2]、朴 時範[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、福田 達也[1]、小暮 健太朗[1]、田中 保[1]([1]徳大院薬・衛生薬学、[2]京大院農・応用生命)
○Katsuya MORITO[1], Ryota SHIMIZU[1], Nahoko KITAMURA[2], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Tatsuya FUKUTA[1], Kentaro KOGURE[1], Tamotsu TANAKA[1] ([1]Dept. Pharm. Health Chem., Inst. Biomed. Sci., Univ. Tokushima Grad. Sch., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】我々が日常的に摂取している脂肪酸のうち、リノール酸などの不飽和脂肪酸は乳酸菌などの腸内細菌による代謝を受け、脂肪酸鎖の中ほどでヒドロキシ基やカルボニル基が導入されることが知られている。我々はこの特徴的な脂肪酸を腸管から吸収しているが、その代謝はよくわかっていない。ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪酸など、ミトコンドリアでは代謝できない特殊な脂肪酸も酸化消去する。本研究では、腸内細菌によって産生されるオキソあるいはヒドロキシ脂肪酸がペルオキシソームで代謝される可能性について検討した。
【方法】実験には既報[1)]に従い酵素合成した 10-ヒドロキシ-12-オクタデセン酸 (HYA)、10-ヒドロキシオクタデカン酸 (HYB)、10-オキソ-12-オクタデセン酸 (KetoA)、10-オキソオクタデカン酸 (KetoB) およびリシノール酸 (RA) を用いた。これらの脂肪酸と共にチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の野生型またはペルオキシソーム欠損細胞をインキュベートすることにより細胞に脂肪酸を取り込ませた。培養上清、細胞中の各脂肪酸量は、抽出した総脂質より調製した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーに供し、測定した。
【結果・考察】ペルオキシソーム欠損細胞は野生型と比べ、HYA、HYB、KetoA、KetoB および RA のいずれも多く蓄積した。この傾向はオキソ脂肪酸 (KetoA、KetoB) よりもヒドロキシ脂肪酸 (HYA、HYB、RA) においてより顕著であった。ペルオキシソーム欠損細胞に最も蓄積した脂肪酸は HYB であった。HYB 添加 24 時間後の培養上清に残存する添加脂肪酸量を調べた結果、ペルオキシソーム欠損細胞と野生型間で大きな違いはないことがわかった。このことから、両細胞間における HYB の細胞内蓄積量の差は細胞への取り込み効率の差ではなく、取り込んだ HYB の代謝速度の差に起因する可能性が示唆された。乳酸菌などの腸内細菌によって産生されたオキソあるいはヒドロキシ脂肪酸は、動物細胞内のペルオキシソームにおいて代謝を受けている可能性が高いと考えられる。

1) S. Kishino, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110(44)**, 17808-17813(2013).

peroxisome, fatty acid, enteric bacteria

発表責任者：森戸克弥（c401741008@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：3B03p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B03 会場

温州みかん由来セラミドによる表皮セラミド産生促進作用

Sphingolipid derived *Citrus unshiu* promotes ceramide production.

○沢田 翔一、中島 賢則、山本 浩明 (株式会社ダイセル)
○Shoichi SAWADA, Takanori NAKAJIMA, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel corporation)

【背景・目的】

セラミドは皮膚角質層の細胞間脂質の主要成分であり、肌の保湿作用、皮膚バリア機能などの機能性を有することから、美肌効果が期待される機能性食品素材として注目されている。セラミドは長鎖アミノアルコールを基本骨格とするスフィンゴイド塩基と長鎖脂肪酸から構成され、蒟蒻や米など様々な植物由来のセラミドが報告されているが、それを構成するスフィンゴイド塩基の構造によって特徴付けられている。

我々は温州みかんに含まれる主要セラミドがアグリコン体であり、フィトスフィンゴシン(PS)が主要なスフィンゴイド塩基であることを明らかにした。これらが植物由来としては特徴的なヒトセラミドに近い構造を有することに着目し、ジュース搾汁工程で生成する温州みかんパルプを原料とした酵素処理によってセラミド濃度を高めたみかんセラミド(mCER)を開発した。本研究では、mCER がヒトの表皮における保湿、皮膚バリア機能に及ぼす影響を明らかにするために、正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)、3 次元皮膚モデルを用いたセラミド産生促進作用について検討した。

【方法・結果】

NHEK を 37℃、CO_2 5%の条件化で 90%コンフルエントまで培養した後、20μM PS または 30μg/mL 精製 mCER を含む培地に交換してさらに 24 時間培養を行い、セラミド生合成関連遺伝子の発現レベルを RT-PCR で測定した。その結果、PS を添加した場合、SPTLC2 や CerS1、ELOVL1, 4, 7 において発現量向上の傾向が認められ、特にβGCase において有意に発現量が向上した。更に、10μg/mL PS、または精製 mCER を含む培地で 3 次元皮膚モデル(EPI-MODEL 6D)を 24 時間培養した後、脂質成分を抽出し、HPTLC で展開後、画像解析によりセラミド産生量を測定した。その結果、PS を添加した場合、セラミド NS、及びセラミド AP の産生量がコントロールと比較して有意に向上した。また、精製 mCER を添加した場合、セラミド NS の産生量がコントロールと比較して有意に向上した。更に、ラットを用いた血中動態試験において、mCER は他の植物由来セラミドに対して、高い血中移行性を有することも示された。以上の結果から、mCER は経口摂取することにより血中セラミド濃度を高め、表皮基底において、セラミドアグリコン自体、あるいは代謝された PS によってセラミド生合成が活性化され、表皮中のセラミド産生量を向上させることが期待される。

ceramide, sphingolipid, phytosphingosine

発表責任者：沢田翔一（si_sawada@jp.daicel.com）

講演番号：3B03p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B03 会場

こんにゃく由来セラミドによるアルツハイマー病予防効果
Preventive effects of dietary konjac ceramide on the Alzheimer's brain
○高橋 香織[1,2]、湯山 耕平[2]、向井 克之[1,2]、五十嵐 靖之[2]([1]株式会社ダイセル、[2]北海道大学大学院先端生命科学研究院)
○Kaori TAKAHASHI[1,2], Kohei YUYAMA[2], Katsuyuki MUKAI[1,2], Yasuyuki IGARASHI[2] ([1]Daicel Corporation, [2]Hokkaido University)

アルツハイマー病は、認知症の過半数を占める神経変性疾患であり、加齢とともにその発症率は上昇する。高齢化が進行するなか、2025 年には約 700 万人が認知症になると推計されており、その対策が求められている。アルツハイマー病の病理学的特徴として、老人班、神経原繊維変化といった異常構造物の沈着が挙げられる。これら異常構造物の沈着に伴い、神経細胞の脱落、シナプスの密度低下が引き起こされ、最終的に認知機能が低下する。初期病理の老人斑は、アミロイドβ(Aβ)と呼ばれるタンパク質の細胞外蓄積であり、通常は Aβ の合成と分解のバランスが取れているため、過剰な Aβ が脳内に蓄積することはない。しかしながら、一度そのバランスが崩れると、脳内に Aβ が蓄積し、アルツハイマー病を発症する危険性が高まる。

当研究グループでは、アルツハイマー病の予防法開発を目的に、エクソソームの Aβ クリアランス作用に着目し研究を行っている。エクソソームは、細胞から放出される約 100 nm の膜小胞であり、エンドソーム膜の一部を起点に、ESCRT タンパク質複合体、または膜脂質のセラミド依存的な機構により産生される。これまでの研究により、Aβ が神経細胞から放出されるエクソソームに結合すること、さらには、Aβ がエクソソームと結合したままミクログリアに取り込まれ分解されることが明らかとなっている。また、ヒト神経細胞株を用いた実験において、セラミドの添加がエクソソームの産生を促進すること、培養液中 Aβ 濃度を低下させることが示された。今回、セラミドの in vivo におけるアルツハイマー病予防効果を検証するため、アルツハイマー病モデルマウス(ヒト APP^{SweInd}Tg マウス)を用いた実験を行った。こんにゃく芋から抽出したグルコシルセラミドをモデルマウスへ 2 週間継続的に経口投与し、投与後に脳組織中の Aβ 量を測定した。その結果、グルコシルセラミド投与群では、有意な Aβ 含量の減少が確認された。また、抗 Aβ 抗体で免疫組織染色を行ったところ、投与群では老人斑様の Aβ 沈着の減少も認められた。こんにゃくグルコシルセラミド摂取には、脳内 Aβ 除去作用があると考えられる。今後この除去作用のメカニズムに関して詳細な解析が必要であるが、こんにゃくセラミドはアルツハイマー病予防のための機能性食品素材としてその有用性が期待される。

ceramide, Alzheimer's disease, exosome

講演番号：3B03p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B03 会場

ビワ葉と緑茶三番茶葉を揉捻混合して製造した発酵茶葉はヒトの体脂肪を減少させる
Fermented tea leaves manufactured by tea-rolling processing of loquat leaves and third crop green tea leaves reduce body fat in humans

○田中 一成[1]、湯浅 正洋[1]、山本 咲暁子[1]、大曲 勝久[1]、宮田 裕次[2]、田中 隆[3]、小野 博之[4]、丸勇史[4]、山村 春男[5]([1]長崎県大栄養健康、[2]長崎県農林技セ、[3]長大医歯薬学、[4]アリメント工業（株）、[5]（株）シャルレ)
○Kazunari TANAKA[1], Masahiro YUASA[1], Sakiko YAMAMOTO[1], Katsuhisa OMAGARI[1], Yuji MIYATA[2], Takashi TANAKA[3], Hiroyuki ONO[4], Isafumi MARU[4], Haruo YAMAMURA[5] ([1]Univ. Nagasaki, [2]Nagasaki Pref. Agric. Forest. Exp. Stat., [3]Nagasaki Univ., [4]Aliment Industry, [5]Sharle)

【目的】夏場に摘採される緑茶三番茶葉はカテキン含量が多く苦味が強いことから、必ずしも有効に利用されていない。長崎県特産のビワ葉もほとんど利用されていないが、ビワ葉にはカテキンの酸化重合を促進する成分や酵素が含まれている。演者らは緑茶三番茶葉とビワ葉を混合揉捻することで緑茶葉に含まれるカテキンの酸化重合を促進して発酵茶を生成するという新たな技術を開発した。この発酵茶はラットにおいて脂質濃度低下作用、体脂肪減少作用を発揮することを繰り返し観察してきた。本研究では、このビワ葉混合発酵茶葉の粉末を長期摂取してヒトの体脂肪に及ぼす影響を検討した。
【方法】（実験 1）大学 3 年生から大学院 2 年生までの女子学生 29 名（平均年齢 20.9 歳）を被験者とした。試験はランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法で実施した。ビワ葉混合発酵茶葉粉末 1.2g を含む分包（試験食品）と茶葉を含まない粉末分包（プラセボ食品）を被験食品とした。被験食品 1 包を 1 日の食事のいずれかの直前に水あるいは湯に混ぜて 12 週間摂取させた。摂取開始直前、4 週後、8 週後、12 週後および摂取終了 4 週（後観察期間）後に、内臓脂肪面積、体重、体脂肪率、BMI、ウエスト周囲径、血圧を測定した。(実験 2) 本学の治験ネットワークに登録し、内臓脂肪面積が 60cm^2 以上の男女 28 名を被験者（平均 56.2 歳）とした。試験は実験 1 と同じ方法で実施し、試験食品の摂取方法も実験 1 と同様に行った。試験期間は 8 週間とし、測定項目は実験 1 の項目以外に採血による血液成分の分析も行った。なお本研究は、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の精神に則り、被験者の人権保護に配慮し、本学の倫理委員会の承認を得て実施した。
【結果および考察】（実験 1）内臓脂肪面積は試験食品摂取で減少する傾向を示し、8 週後にプラセボ摂取より有意に低値であった。12 週後の値には両群間で差はなくなり、摂取終了 4 週後の値は同じであった。ウエスト周囲径は試験食品摂取で 12 週後にプラセボ食品摂取より低い傾向であった。（実験 2）内臓脂肪面積は試験食品摂取で経時的に減少した。60 歳以下の被験者で 8 週後の内臓脂肪面積は摂取開始時より有意に低下し、その値はプラセボ食品摂取より有意に低値であった。本発酵茶葉は膵リパーゼ活性を阻害することが観察され、その作用はテアフラビン類とカテキン重合ポリフェノールにより強く発揮されることが示された。これらの結果から、ビワ葉混合発酵茶葉粉末長期摂取は小腸からの脂肪の吸収を抑制することで、健常な若年女性および中年者の内臓脂肪面積を低下させる効果を有することが明らかとなった。

fermented tea leaves, body fat, catetine polymerized polyphenol

発表責任者：田中一成（katanaka@sun.ac.jp）

講演番号：3B03p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B03 会場

食用菊「寿」含有フラボノイドの 3T3-L1 細胞に対する作用

Effects of Flavonoid Glycosides from Edible *Chrysanthemum* "Kotobuki" in 3T3-L1 cells.

○仁科 淳良[1]、浮谷 基彦[1]、深津 誠[1]、山本 純平[2]、服部 一夫[3]、平井 康昭[4]（[1]日大理工、[2]麻布大、[3]東農大、[4]昭和大）
○Atsuyoshi NISHINA[1], Motohiko UKIYA[1], Makoto FUKATSU[1], Jyunpei YAMAMOTO[2], Kazuo HATTORI[3], Yasuaki HIRAI[4] ([1]Nihon Univ., [2]Azabu Univ., [3]Tokyo Agric. Univ., [4]Showa Univ.)

【目的】肥満は、Ⅱ型糖尿病、高血圧、心血管傷害、がんと直接関連している。一方、脂肪細胞は、アディポサイトカインを分泌し、代謝や多くの組織の機能に影響を及ぼすことが知られている。これまでに共同研究者の山本らは食用菊の熱水抽出物が脂肪細胞分化 3T3-L1 細胞に対し、細胞の小型化やアディポネクチンの産生増加、グルコースの吸収促進などの作用を示すとともに、Ⅱ型糖尿病モデルマウスに対して抗糖尿病作用、すなわちインスリン抵抗性の改善、血糖値および肝臓の脂質含量低下作用を示すことを明らかにした。我々は、次のステップとして上記食用菊熱水抽出物中の抗糖尿病成分の探索を試みた。
【方法】山形県で購入した食用菊（寿）の乾燥物から得た熱水抽出物からヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分を調製した。生理活性が認められた画分に含まれる成分の単離には各種クロマトグラフィーを使用した。単離化合物の化学構造は NMR スペクトル、MS 等を測定して同定した。抽出物と単離化合物の生理活性はインスリン等で脂肪細胞分化した 3T3-L1 前駆細胞の脂肪蓄積量、細胞のサイズを陽性対照のチアゾリジン系抗糖尿病剤（ロシグリタゾン）と比較することにより判断した。さらに、活性成分で刺激した 3T3-L1 細胞中の脂肪細胞分化関連タンパク質の増減、リン酸化のレベルをウエスタンブロットにより測定して作用メカニズムの推定を試みた。
【結果】生理活性が比較的強かった食用菊熱水抽出物のメタノール画分をダイヤイオン HP-20 カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC 等を用いて精製し、4 種のフラボノイド配糖体を単離した。単離化合物の分化 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積量に対する作用は微弱であったが、ぞれぞれのアグリコンには参照化合物として用いたロシグリタゾンと同等の脂肪蓄積量増加作用が認められた。ウエスタンブロットで単離したフラボノイド配糖体とアグリコンの脂肪細胞分化関連タンパクに対する作用を測定して測定した結果、アグリコンは分化誘導と脂質合成関連タンパクとわずかではあるがアディポネクチンの発現を高めることが分かった。また、脂質分化誘導作用を示したアグリコンは細胞内情報伝達関連キナーゼのうち、Akt のリン酸化を高めた。一方、PPARγ アンタゴニスト（BAGDE）と Akt 阻害剤（Wortmannin）によりアグリコンの作用を抑制されたことから、当該化合物は、IRS/Akt 経路の活性化と PPARγ のアゴニストとしての作用により、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を促進すると考えた。
以上の結果から、食用菊熱水抽出物中のフラボノイド配糖体とそのアグリコンが先行研究における当該抽出物の抗糖尿病作用に関与している可能性が示唆された。

3T3-L1 cells, Diabetes, Chrysanthemum

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B03p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B03 会場

イサダ由来新規機能性成分 8-HEPE 濃縮素材の開発

Development of a healthy product contained high concentration 8-HEPE from pacific krill.

○山田 秀俊、熊谷 加奈子、白石 明子、四戸 啓太郎、矢野 明（岩手生工研）
○Hidetoshi Yamada, Kanako Kumagai, Akiko Shiraishi, Keitaro Shinohe, Akira Yano (IBRC)

8-HEPE は EPA の８位炭素に水酸基が導入された化合物であり、EPA よりも高いペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）活性化作用を有する。我々はこれまでに、三陸で水揚げされるイサダ（ツノナシオキアミ）に抗肥満効果があり、イサダの抗肥満効果が 8-HEPE による肝臓の脂肪燃焼促進によって発揮されていることを示してきた。8-HEPE は一部の甲殻類に含有される成分であり、イサダにおいて含有量が高いことがわかっている。

三陸地域では 1970 年代後半からイサダ漁が行われてきた。毎年３月から４月にかけて行われるイサダ漁は、春の閑散期に漁が行え、安定漁獲が見込める魚種であり、三陸漁業者の経済的安定に長く貢献してきた。しかしながら、イサダの主な利用用途であった養殖魚の餌や釣りの撒き餌としての需要が 80 年代をピークに減少し続け、現在は価格維持のための漁獲制限を余儀なくされ、市場が 10 分の１近くまで減少している。そこで我々は、イサダの高付加価値化と新たな利用用途創出による需要喚起のために、8-HEPE を特徴とした機能性素材の開発に取り組んでいる。

これまでは、水分量 10%未満まで熱風乾燥したイサダを原料として、アルコール抽出と疎水樹脂での分画によって 8-HEPE 濃縮素材のみを製造する工程での生産を試みてきたが、原料ごとに 8-HEPE 含有量の変動が大きいこと、遊離型 EPA との分画が困難であるために濃縮物中の 8-HEPE 含有量が 1%に留まっていることが課題であった。そこで、8-HEPE 濃縮素材の安定生産のために漁期のイサダにおける 8-HEPE 含有量の測定と自己酵素を活用した 8-HEPE 増加反応条件の検討を行い、8-HEPE 高度濃縮のための液-液分離条件の検討を行なった。

３月、４月の漁期に水揚げされるイサダにおける 8-HEPE 含有量は約 10ppm から 30ppm の範囲であること、4℃から 10℃で自己酵素反応を誘導することで 8-HEPE 含有量を数倍に高めることが可能であること、エタノール-ヘキサン-水を用いた液-液分離によって、8-HEPE と EPA の分画が可能であることを見出し、8-HEPE を 10%以上含有する濃縮素材の作製方法を構築した。

8-HEPE, Pacific krill

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：3B03p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B03 会場

イサダからのリポキシゲナーゼ同定と 8-HEPE の酵素的生産への利用

Identification of Lipoxygenase gene from pacific krill to use enzymatic production of 8-HEPE

○結城 彩花[1]、植村 亜衣子[1]、松村 英生[2]、矢野 明[1]、山田 秀俊[1] ([1]岩手生工研、[2]信州大学基盤研究支援センター)
○Sayaka YUKI[1], Aiko UEMURA[1], Hideo MASTUMURA[2], Akira YANO[1], Hidetoshi YAMADA[1] ([1]IBRC, [2]Shinshu University, Research Center for Supports to Advanced Science)

イサダ（ツノナシオキアミ）は EPA の８位炭素に水酸基が付加した 8-HEPE を数 10ppm 含有する。8-HEPE は EPA よりも高いペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）活性化作用を有しており、肥満や糖尿病など代謝疾患の予防・改善効果が見込まれる化合物である。現在、我々はイサダから 8-HEPE 濃縮素材を作製し、機能性食品素材としての実用化に取り組んでいるが、イサダから得られる 8-HEPE は微量であり、新規機能性成分や医薬品として活用するためには、8-HEPE の酵素的産生技術が必要になる。イサダには 8-HEPE 以外にもアラキドン酸の８位に水酸基が導入された 8-HETE や DHA の 10 位に水酸基の導入された 10-HDoHE が数 ppm 含有されている。このことは、EPA やアラキドン酸、DHA を基質にして n-12 位を酸化する酵素をイサダが有していることを示唆している。実際に、イサダ由来の蛋白質と EPA を 20℃でインキュベートすると、8-HEPE が産生されることを見出している。哺乳動物や植物での先行研究で、不飽和脂肪酸はリポキシゲナーゼによって部位特異的に酸化されることが知られている。

そこで本研究では、イサダからリポキシゲナーゼ遺伝子を同定し、8-HEPE の酵素的生産技術の基礎を構築することを目的として研究を行なった。

イサダのリポキシゲナーゼ遺伝子を同定するため、イサダの *de novo* RNA Seq とリポキシゲナーゼ遺伝子配列候補を Blast にて検索し、３つのリポキシゲナーゼ候補遺伝子を得て、Pacific krill Lipoxigenase（PKLOX）1-3 とした。そのうちリポキシゲナーゼドメインがコードされていたのは PKLOX１であり、PKLOX2、3 は部分配列であると考えられたので、RACE による完全長 cDNA 配列解析を行なった。PKLOX1 遺伝子は大腸菌、哺乳動物細胞でのタンパク質発現を試み、70-80kDa のタンパク質発現とリポキシゲナーゼ活性を確認した。現在は、昆虫細胞での PKLOX1、PKLOX2 の発現と基質特異性や n-12 位特異的な酸化活性の解析を行なっている。

8-HEPE, Lipoxygenase, Pacific Krill

発表責任者：山田秀俊（h-yamada@ibrc.or.jp）

講演番号：3B04a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B04 会場

ニンニク由来香気成分が血管内皮における外因系血液凝固因子の発現に及ぼす影響について
The effect of garlic derived flavor component on the expression of extrinsic coagulation factors produced by endothelial cells.
○有賀 彩和子[1]、田村 千尋[1]、矢口 真実[2]、増澤(尾﨑) 依[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大・生資科・生命化、[2]日大院・生資科・応生科)
○Sawako ARIGA[1], Chihiro TAMURA[1], Manami YAGUCHI[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】我が国の血栓性疾患による死亡者数の総計は、死因の第一位であるがんによる死亡者数にほぼ匹敵し、予防法の確立は急務である。血栓性疾患は、外因系凝固の惹起因子 Tissue Factor(TF)が起点となっており、TF の発現と活性の抑制は血栓性疾患の予防法を考案する上で重要である。組織因子経路インヒビター(TFPI)は TF に対する生理的な阻害因子であり、血栓形成を抑制する。ニンニクは抗血栓作用、抗炎症作用、抗肥満作用などの様々な薬理作用を示し、ニンニク由来のスルフィド類がこれらの機能性を担っている。当研究室の先行研究ではニンニクの抗血栓作用のメカニズムとして血小板凝集の抑制を報告している。本研究ではニンニクの香気成分の 1 つである Diallyl trisulfide(DATS)が TF の発現や活性に及ぼす影響を明らかにし、ニンニクの抗血栓作用メカニズムの一端を解明することを目的とした。
【方法】血管内皮細胞のモデルとしてヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)もしくはヒト不死化臍帯静脈血管内皮細胞(HUEhT-1)を用いて TF, TFPI の発現に及ぼす DATS の影響について検討した。HUVEC, HUEhT-1 に DATS を種々濃度で添加し 30 分前処理した後に TNF α を終濃度 1 ng/mL となるように添加し TF mRNA と TF タンパク質発現について qPCR と Western blotting によって解析した。TF 発現に関与するシグナルを解明する目的で、JNK リン酸化阻害剤 SP600125, IKK リン酸化阻害剤 BAY11-7082 を 30 分前処理した後 TNF α で刺激し、同様に TF 発現を解析した。また、HUEhT-1 を用いて DATS が TFPI の発現に及ぼす影響について検討した。
【結果】HUVEC における TF mRNA 発現は、TNF α により約 40 倍に増加した。終濃度 100 μM の DATS で前処理した HUVEC では、TNFα による TF mRNA 発現誘導は対照群と比較して約 10%に抑制された。TF タンパク質の発現は、TNF α 刺激 4 時間後に最大となったが、この TF タンパク質発現も DATS の前処理により濃度依存的に抑制された。また MAP キナーゼシグナルと NFκB シグナルに及ぼす DATS の影響について検討したところ、DATS の前処理は、TNF は刺激 15 分後の JNK のリン酸化と IkB の分解を抑制した。一方、DATS は p38 及び ERK のリン酸化を促進した。TF mRNA 発現は BAY11-7082 により約 30%にまで抑制されたが、タンパク質発現にはほとんど影響を及ぼさなかった。DATS の添加培養により TFPI mRNA 発現は増加する傾向を示した。
【結論】ニンニク由来香気成分 DATS は、TF の発現や活性を抑制することにより抗血栓作用を示す可能性が明らかになった。

Blood coagulation, Tissue factor, Diallyl trisulfide

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B04a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B04 会場

ADP による血小板凝集に着目したガーリック由来香気成分の抗血栓作用メカニズムの解明

The effect of garlic-derived compound on ADP-induced platelet aggregation.

○中口 夏美、増澤（尾﨑） 依、細野 崇、関 泰一郎（日大院・生資科・応生科）
○Natsumi Nakaguchi, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad. School)

【目的】血小板機能の亢進は、生活習慣病の終末病態である心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性疾患発症の原因となっている。血小板は血栓形成の初期反応に深く関与し、血小板の ADP 受容体 P2Y12 は臨床的に重要ないくつかの薬剤の分子標的となっている。我々は食による血栓性疾患のリスクの軽減、予防を目指して、食品や香辛料由来成分の抗血栓作用について研究を行ってきた。本研究では ADP による血小板凝集に着目し、ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide (DATS) が血小板機能に及ぼす影響を検討し、DATS の抗血栓作用メカニズムの一端を明らかにしようとした。
【方法】C57BL/6J マウスから洗浄血小板を調製した。DATS あるいは p38MAPK 阻害剤 SB203580, Akt リン酸化阻害剤 wortmannin, PP242 を前処理した洗浄血小板に ADP を添加して凝集を惹起し、アグレゴメーターにより凝集能を測定した。さらに、血小板の活性化シグナルである PI3K/Akt 経路の Akt やその下流の Gsk3β, MAPKs のリン酸化、cAMP 経路の vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)の脱リン酸化についてウエスタンブロッティングにより解析した。
【結果・考察】DATS は ADP による血小板凝集を濃度依存的に抑制した。ADP は PI3K/Akt 経路の Akt (Ser_{473}), Gsk3β, p38 MAPK をリン酸化したが、Akt (Thr_{308}), ERK1/2, JNK はリン酸化しなかった。DATS は Akt (Ser_{473}) と Gsk3β のリン酸化を抑制したが、p38MAPK のリン酸化は促進した。しかし、p38MAPK リン酸化阻害剤 SB203580 は血小板凝集を抑制しなかったことから、DATS による p38MAPK のリン酸化の促進は血小板凝集には関与しないことが明らかになった。また、DATS は Akt のリン酸化を抑制したことから、Akt リン酸化阻害剤を用いて DATS と同様な作用を示すか検討した。Wortmannin, PP242 は ADP による血小板凝集を抑制し、Akt (Ser_{473})と Gsk3β のリン酸化を抑制した。このことから、ADP による血小板凝集には Akt (Ser_{473}) のリン酸化が重要であることが明らかになった。さらに、cAMP 経路における VASP の脱リン酸化について検討した。ADP はリン酸化 VASP を減少させたが、DATS はその減少をキャンセルした。以上の結果から、DATS は PI3K/Akt 経路と cAMP 経路の両者を阻害することで、血小板凝集を抑制する可能性が明らかになった。DATS による ADP 凝集抑制メカニズムについて、現在 P2Y12 過剰発現細胞を用いて検討中である。
【結論】DATS は ADP 受容体 P2Y12 の PI3K/Akt 経路と cAMP 経路の両者を阻害することで、血小板凝集を抑制する可能性が明らかになった。

platelet, garlic, thrombosis

発表責任者：関 泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B04a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B04 会場

高脂肪食負荷ウィスター京都ラットにおける杜仲葉エキスの抗動脈硬化作用

Antiarteriosclerotic effect of Eucommia leaves extract in Wistar-Kyoto rats fed a high-fat diet

○高橋 佑介[1]、細尾 信悟[2]、山口 翔平[1]、山﨑 遼[1]、平田 哲也[2]、山口 康代[2]、山崎 寛生[2]、中村 浩蔵[1] ([1]信州大農、[2]小林製薬株式会社)
○Yusuke TAKAHASHI[1], Shingo HOSOO[2], Shohe YAMAGUCHI[1], Ryo YAMAZAKI[1], Tetsuya HIRATA[2], Yasuyo YAMAGUCHI[2], Hiroo YAMASAKI[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kobayashi Pharmaceutial Co., Ltd.)

【目的】
杜仲葉にはゲニポシド酸，アスペルロシドやクロロゲン酸などの機能性成分が豊富に含まれており，杜仲葉エキス（ELE）は血圧降下および抗肥満作用を有することが報告されている．本研究では動脈脂肪沈着を起こしやすい Wistar Kyoto（WKY）ラットを高脂肪食で飼育し，ELE の内臓脂肪蓄積，血圧，血管への効果を検討した．
【方法】
雄性 7 週齢 WKY ラットを普通食（MF 群，n=7），高脂肪食（HFD 群：30%ラード含有，n=8）および高脂肪食＋5%ELE（HFD-ELE 群，n=8）の 3 群に分け，各飼料及び水を自由摂取させて 10 週間飼育した．飼育期間中，摂餌量，摂水量，体重を毎週 2 回測定し，血圧を毎週 1 回テイルカフ法で測定した．飼育終了後，採血と胸部大動脈の摘出を行った後，臓器周囲脂肪重量（腸間膜動脈，右腎臓）を測定した．摘出した胸部大動脈から血管リング標本を作成，血管等尺性張力試験に供し，アセチルコリンとニトロプルシドナトリウムを用いて血管反応性を調査した．また，胸部大動脈の血管平滑筋（SMA）染色によって血管中膜厚を測定した．採取した血液から血液サンプルと血清サンプルを作製し，生化学検査に供することで，ELE 摂取による血液成分への影響を調査した．
【結果】
HFD 群では MF 群よりも，体重，内臓脂肪量，血圧が有意に増加し，軽度の肥満および高血圧状態を示したが，HFD-ELE 群では HFD 群よりも，いずれも有意に低値であった．血管反応性には 3 群間で有意な差異はなかった．血管中膜は，HFD 群で MF 群と比較して有意に肥厚していたが，HFD-ELE 群では中膜肥厚が有意に抑制された．血中レプチンは高脂肪食摂取によって HFD 群，HFD-ELE 群で有意に増加し，アディポネクチンが HFD-ELE 群でのみ有意に増加した．その結果，HFD-ELE 群で動脈硬化予防の指標であるアディポネクチン／レプチン比が HFD 群よりも有意に高値であった．以上の結果から，高脂肪食負荷 WKY ラットにおいて、ELE 摂取による血圧上昇抑制，アディポネクチン量増加に伴う血管形態維持および血中アディポネクチン/レプチン比上昇による動脈硬化予防の可能性が示された．

arteriosclerosis, adiponectin, Eucommia leaves extract

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B04a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B04 会場

Piperine の血圧低下作用における一酸化窒素の関与

Involvement of nitric oxide in the blood pressure-lowering effects of piperine

○山上 友希子、迫 康弘、室賀 翔太、小野 智美、小泉 千枝、小川 伸一、高岡 彰子（大正製薬株式会社　セルフメディケーション開発研究所　基盤研究室）
○ Yukiko YAMAKAMI, Yasuhiro SAKO, Shota MUROGA, Tomomi ONO, Chie KOIZUMI, Shin-ichi OGAWA, Akiko TAKAOKA (Taisho Pharmaceutical Co., LTD, Self-Medication R&D Laboratories, Health Science Research)

【背景・目的】東南アジアに分布する蔓性常緑木本であるヒハツは、古来より香辛料として用いられている植物であり、国内でも主に琉球列島において利用されている。また、多彩な薬理作用を持つことが報告されており、健康維持・増進における効果が注目されている。ヒトにおいては、ヒハツ抽出物を配合した食品の摂取 1 週間後という早期から十分な降圧作用が見られたことが報告されている（薬理と治療 2015; 43(8): 1127-39.）が、その作用機序の詳細については不明な点が残されている。そこで、piperine の血圧低下作用における詳細な作用機序の解明を目的とし、本研究を実施した。
【方法】正常ラットを用い、angiotensin I（ATI）惹起昇圧反応（in vivo）に対する piperine の作用を評価した。次に、ラット摘出胸部大動脈標本を用いて、phenylephrine（PE）惹起血管収縮（in vitro）に対する piperine の作用を評価し、血管内皮細胞及び一酸化窒素合成酵素（NOS）の関与を検討した。最後に、正常ヒト大動脈内皮細胞を用いて、piperine の細胞内一酸化窒素（NO）量に対する作用を評価した。
【結果】Piperine 11.25 mg/kg をラットに十二指腸内投与することにより、ATI による昇圧反応が有意に抑制された。また、piperine 10、30 及び 100 μmol/L の添加により、PE 惹起血管収縮が濃度依存的かつ有意に抑制され、piperine によるこの血管弛緩作用は、血管内皮細胞除去または NOS 阻害剤である L-NAME を前処理することにより有意に減弱した。さらに piperine 30 及び 100 μmol/L を添加することにより、正常ヒト大動脈内皮細胞内の NO 量が有意に増加した。
【考察・結論】血管内皮細胞においては、活性化 endothelial NOS が arginine を代謝することで NO を産生し、産生された NO が血管平滑筋に作用して血管を弛緩させる。本研究において、piperine の血管弛緩作用が血管内皮細胞除去または NOS 阻害により減弱したこと、piperine が培養内皮細胞の細胞内 NO 量を増加させたことから、piperine は血管内皮細胞からの NO 産生を促進することにより血管を弛緩させることが示唆された。Piperine を含有するヒハツ抽出物を配合した食品は、上記のメカニズムにより正常高値血圧者及び I 度高血圧者における血圧低下作用を発現していると考えられ、高血圧の予防に大きく寄与することが期待される。

piperine, blood pressure, nitric oxide (NO)

発表責任者：高岡彰子（a-takaoka@taisho.co.jp）

講演番号：3B04a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B04 会場

Effects of long pepper extract on peripheral coldness in Japanese healthy women

○ Susumu Yoshino[1], Miyake Yasuo[1], Kuwahara Hiroshige[1], Shuji Nakata[2] ([1]Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd., [2]CLINTEXE Clinic)

Objective

Peripheral coldness can sometimes be unbearable, and may be associated with decreased peripheral blood flow. Because long pepper extract is known to improve blood flow, it might be a useful approach in the treatment of peripheral coldness. However, clinical data regarding the effects of long pepper extract on peripheral coldness are lacking. The objective of the present study was to assess the long pepper extract on peripheral coldness in healthy women.

Methods

Thirty healthy women aged 20-64 years completed this randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. The primary endpoint was assessment of peripheral blood flow and skin temperature after cold water stress.

Results

All subjects completed this study without abnormal events regarding subjective and objective symptoms during the observation period. Peripheral blood flow and skin temperature were statistically significantly higher after cold water stress with consumption of long pepper extract than with consumption of placebo.

Conclusion

Our data suggest that a single oral intake of long pepper extract increases the peripheral blood flow and skin temperature after cold stress, and is a potential tool for the prevention and improvement of peripheral coldness in healthy women.

peripheral coldness, long pepper extract, randomized controlled trial

講演番号：3B04a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B04 会場

ゲニポシド酸の経口摂取は高血圧自然発症ラットにおいて心房性ナトリウム利尿ペプチドの分泌を促進する

Oral Administration of Geniposidic Acid Induce Secretion of Atrial Natriuretic Peptide in Spontaneously Hypertensive Rats

○山口 翔平[1]、細尾 信悟[2]、高橋 佑介[1]、山﨑 遼[1]、高橋 伶仁[1]、平田 哲也[2]、山口 康代[2]、山崎 寛生[2]、南野 直人[3]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]小林製薬株式会社、[3]国立循環器病研究センター)
○ Shohei YAMAGUCHI[1], Shingo HOSOO[2], Yusuke TAKAHASHI[1], Ryo YAMAZAKI[1], Ryuto TAKAHASHI[1], Tetsuya HIRATA[2], Yasuyo YAMAGUCHI[2], Hiroo YAMASAKI[2], Naoto MINAMINO[3], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shishu Univ., [2]Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., [3]National Cerebral and Cardiovascular Center)

【目的】ゲニポシド酸（GEA）は杜仲（*Eucommia ulmoides* Oliver）などの薬用植物に広く含まれているイリドイド配糖体の一つである。我々は GEA を主要成分とする杜仲葉抽出物（ELE）の経口投与により、高血圧自然発症ラット（SHR）の血圧上昇抑制、血管肥厚抑制、血中一酸化窒素濃度増加作用、高脂肪食負荷ウィスター京都ラットの内臓脂肪重量抑制、血中アディポネクチン増加作用、血管肥厚抑制などを報告した［1］［2］。GEA には降圧作用や血管保護作用が報告されているが、詳細な生体作用メカニズムは不明である。近年、イリドイド化合物の *in vitro* グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体アゴニスト活性が報告された[3]。心筋細胞上 GLP-1 受容体に GLP-1 アゴニストが作用すると ANP 分泌が促進される［4］。そこで本研究では、SHR への GEA 単回経口投与が ANP 分泌に与える影響を評価することを目的とした。
【方法】雄性 16 週齢 SHR に GEA100 mg/kg body weight を単回経口投与し（GEA 群;n=6）、投与 6 時間後にテイル・カフ法（Softron-BP98A）により血圧測定を行った後、速やかに腹部大動脈より採血し、血漿を調製した。得られた血漿について GEA、ANP、GLP-1 濃度をそれぞれ LC-MS/MS、Sandwich CLEIA、ELISA 法により測定した。純水投与したものを対照（コントロール群;n=6）とした。
【結果】投与 6 時間後に GEA 群でコントロール群に対して有意に収縮期血圧が低下した。GEA は、GEA 群の血漿のみから検出され、ANP 濃度は GEA 群においてコントロール群の約 1.5 倍の有意な高値（$p<0.01$）を示した。一方で GLP-1 濃度に両群間で有意な差はなかった。本試験の結果から経口摂取した GEA が血中に移行し、GLP-1 受容体アゴニストとして ANP 分泌を促進する可能性が示された。ANP は心血管系において有益な生理活性を広範に示す重要なホルモンである。天然物中に存在する成分が GLP-1 受容体アゴニストとして ANP 分泌を促進する報告はなく、本研究結果により薬用植物のより広範な利用の可能性が期待される。

［1］ Hosoo, S. et al. (2015) *Molecules*, 20, 21971-81.
［2］ Hosoo, S. et al. (2017) *Hypertension Research*, 40, 546-51.
［3］ Gong, N. et al. (2014) *Neuropharmacology*, 84, 31-45.
［4］ Kim, M. et al. (2013) *Nature medicine*, 19, 567-75.

Atrial natriuretic peptide, Geniposidic acid, Spontaneously hypertensive rat

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B04a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B04 会場

腹部大動脈瘤の進展・破裂に対する EPA 高含有魚油の影響の評価

The effect of EPA-rich fish oil on the development and rupture of abdominal aortic aneurysm

○久後 裕菜[1]、橋本 佳祐[1]、宮本 智絵[1]、柳本 賢一[2]、財満 信宏[1]、森山 達哉[1]([1]近畿大院・農、[2]日本水産)
○ Hirona KUGO[1], Keisuke HASHIMOTO[1], Chie MIYAMOTO[1], Kenichi YANAGIMOTO[2], Nobuhiro ZAIMA[1], Tatsuya MORIYAMA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Nippon Suisan)

【目的】腹部大動脈瘤(Abdominal aortic aneurysm; AAA)は、腹部大動脈の進行的な拡張を主病変とする疾患であり、有効な薬物療法や予防法は確立されていない。血管の拡張には血管壁の慢性炎症による脆弱化が関与していると報告されている。また、これまでに血管壁に異常出現する脂肪細胞が AAA 破裂に関与することを報告した。エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)といった n-3 系高度不飽和脂肪酸(n-3PUFA)は魚油に多く含まれ、抗炎症作用および中性脂肪合成抑制作用を有する。本研究は AAA 進展・破裂に及ぼす EPA 高含有魚油の影響を評価することを目的とした。
【方法】SD ラット(6 週齢、オス)を 1 週間予備飼育した後、腹部大動脈結紮処置を施し AAA を誘導した。Control 群には水、Triolein 群にはトリオレイン 1145mg/kg/day、Fish oil 群には EPA 高含有魚油を 1145mg/kg/day の経口投与を開始し、4 週間投与を続けた後、形成された腹部大動脈瘤径を計測した。その後、腹部大動脈はパラホルムアルデヒド固定後に凍結し、クライオスタットで 10μm 切片とした。作成した切片は、病理学的組織染色で病理評価した。
【結果・考察】Control 群と比較して Triolein 群において破裂リスクが有意に上昇したのに対し、Triolein 群と比較して Fish oil 群において破裂リスクが有意に抑制された。血管切片の病理解析により、Triolein 群と比較して Fish oil 群において脂肪細胞の増加と肥大化が抑制されており、脂肪細胞周辺組織において、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)-2 および MMP-9 の陽性面積、マクロファージ陽性面積が減少し、膠原線維破壊が抑制されていた。また、AAA 誘導前からの魚油投与の影響を評価したところ、Fish oil 群において血管径の拡大が有意に抑制されていた。Triolein 群と比較して Fish oil 群において、血管壁における MMP-2、MMP-9 および酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒドの陽性面積は有意に減少しており、膠原線維破壊は有意に抑制されていた。
本研究において、EPA 高含有魚油は血管壁における酸化ストレスの抑制、線維成分の破壊抑制、脂肪細胞蓄積抑制を通じて AAA 進展・破裂を抑制する効果がある可能性が示唆された。

abdominal aortic aneurysm, fish oil, eicosapentaenoic acid

講演番号：3B04a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B04 会場

ローヤルゼリーに含まれる脂肪酸がラット末梢血流に与える影響

Effects of fatty acids in royal jelly on rat peripheral blood flow

○菅 みちる、奥村 暢章、八巻 礼訓、山家 雅之、橋本 健（株式会社山田養蜂場本社）
○ Michiru KAN, Nobuaki OKUMURA, Ayanori YAMAKI, Masayuki YAMAGA, Ken HASHIMOTO (Yamada Bee Company, Inc.)

【目的】ローヤルゼリー（RJ）はミツバチが作り出す天然物質で、古くから老化防止や滋養強壮に良いとされており、近年では肩こりや冷えを改善することから、血流改善作用も期待されている。RJ に含まれる特徴的な脂肪酸である 10-ヒドロキシ-2-デセン酸（10H2DA）および 10-ヒドロキシデカン酸（10HDAA）は、末梢動脈の拡張を誘発する TRPA1 チャネルを活性化する事が報告されているが、血流への影響については報告されていない。よって本研究では RJ および 10H2DA、10HDAA が血流量に及ぼす影響を *in vivo* で検証した。
【方法】RJ はプロテアーゼ分解後凍結乾燥し用いた。RJ（1,200 / 6,000 / 9,000 mg/kg）および 10H2DA（420 mg/kg）、10HDAA（120 mg/kg）は Slc:SD ラットへ胃ゾンデを用いて経口投与した。血流量測定は投与前、初回投与 1、3 時間後、1 週間反復投与 1 時間後に実施した。測定には二次元レーザー血流計を使用し、覚醒下非固定でラットの後肢血流量を評価した。また副次項目として体重、直腸温、血圧、心拍数を評価した。最終血流測定後に採血し、代謝産物の定性分析を実施した。
【結果と考察】血流量は投与前と比較して、RJ 1,200 mg/kg 群は投与 3 時間後に有意な増加が見られた。また 10HDAA 群は投与 1 時間後に、10H2DA 群は投与 3 時間後に有意に血流が増加した。1 週間の反復投与後では、RJ 9,000 mg/kg 群にて投与前と比較して血流増加が見られた。一方、対照群では単回・反復投与共にその前後で有意な差は見られなかった。体温については、RJ 9,000 mg/kg 群が投与 3 時間後に対照群と比較して上昇していたのに対し、投与 7 日目の RJ 1,200 mg/kg 群では低下していた。心拍数は 10H2DA 群において微弱な増加が見られた。試験期間中、体重増加量や血圧には群間の差はなかった。また代謝産物の解析の結果、RJ 投与群の血中に 10H2DA や 10HDAA、およびそれらの代謝物であるデセン二酸やセバシン酸が確認されたが、投与後 48 時間には血中から排出されていた。さらに、10H2DA 群の血中には 10HDAA とセバシン酸が存在したことから、10H2DA はラット体内にてデセン二酸へと酸化されるだけでなく、10HDAA へと還元され、最終的にセバシン酸へ代謝されることが考えられた。セバシン酸は 10H2DA や 10HDAA より強い TRPA1 活性作用を持つ事が知られており、RJ による血流増加のメカニズムとして 10H2DA や 10HDAA のみならずその代謝産物が寄与することが示唆された。【結語】本研究により、RJ をラットに投与すると末梢血流量が増加すること、およびその作用機序の一部には 10H2DA と 10HDAA 及びその代謝物が関与している可能性が示唆された。

royal jelly, blood flow, fatty acid

発表責任者：菅　みちる（mk1642@yamada-bee.com）

講演番号：3B04a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B04 会場

桜島大根抽出成分による血管内皮機能改善効果及び作用機序の解明
Raphanus sativus cv. Sakurajima Daikon improves the vascular endothelial function
○黒田 怜[1]、數村 公子[2]、南 雄二[3]、加治屋 勝子[3] ([1]鹿児島大院農、[2]浜松ホトニクス・中研、[3]鹿児島大農)
○Rei KURODA[1], Kimiko KAZUMURA[2], Yuji MINAMI[3], Katsuko KAJIYA[3] ([1]Grad. Sch. Agri. Kagoshima Univ., [2]Hamamatsu Photonics, [3]Kagoshima Univ.)

【目的】血管の最も内側に存在する血管内皮細胞からは一酸化窒素(NO)が放出されている。NO は、血管の収縮・弛緩の調節や血栓形成の防御など、血管に直接作用し血管を保護している。しかし、酸化ストレス等により血管内皮細胞が傷害され NO の産生が抑制されると、動脈硬化を始めとした血管関連疾患が引き起こされる。そのため、NO 産生能を改善する必要がある。一方、大根は、抗酸化作用・血流改善作用・血栓形成予防効果などが報告されているが、血管に対する影響についての報告は少ない。本研究では、ブタ冠状動脈内皮細胞を用いて、桜島大根抽出成分による NO 産生能改善効果及び作用機序の解明を行った。
【方法】1) 成分の抽出:桜島大根を可食部と非可食部に分類し、ホモジナイズ後に凍結乾燥粉末化した。メタノール/水/酢酸溶液(90:9.5:0.5)を用いて水溶性成分を抽出し、濃縮乾固物とした。
2) 細胞毒性試験:コハク酸塩テトラゾリウム還元酵素を用いて血管内皮細胞に与えることができる抽出物の濃度範囲を決定した。
3) NO 産生量の測定:グリース法を簡便化した 2,3-ジアミノナフタレン(DAN)法と蛍光顕微鏡法を用いた。
4) NO 産生量、細胞質 Ca^{2+}濃度、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$) 産生量の同時測定:蛍光・化学発光同時計測装置 (CFL-C2000 浜松ホトニクス社製) を用いて、DAF2-AM で NO 産生量、Fluo4-AM で細胞質 Ca^{2+}濃度、MCLA で $O_2^{\cdot-}$産生量をリアルタイムで測定した(特許出願済)。
5)内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)発現量の測定:ウエスタンブロットを用いて eNOS とリン酸化 eNOS の発現量を測定した。
6) 機能性成分の同定:LC/MS を用いて NO 産生能改善効果に寄与する成分の探索を行った。
【結果・考察】評価した抽出物の濃度範囲では細胞毒性を示さなかったため、DAN 法を用いて NO 産生量を測定したところ、桜島大根は濃度依存的に NO 産生量を増加させた。蛍光顕微鏡を用いた NO 産生量の測定においても、桜島大根は、比較対象の青首大根よりも NO 産生を増加させることが示された。また、蛍光・化学発光同時計測装置を用いたリアルタイム測定では、NO 産生量と細胞質 Ca^{2+}濃度は、桜島大根の添加により有意に、時間依存的に増加することを明らかにした。尚、血管内皮細胞傷害に関与する $O_2^{\cdot-}$産生量は影響がなかった。さらに、eNOS 発現量をウエスタンブロットにて確認したところ、リン酸化 eNOS の発現を確認した。以上の結果より、桜島大根抽出成分の添加による血管内皮細胞の NO 産生量の増加では、Ca^{2+}チャネルの活性化により細胞質 Ca^{2+}濃度が増加し、eNOS が活性化されることが示唆された。さらに、LC/MS を用いて桜島大根に含まれる機能性成分を絞り込んだ。本研究により、鹿児島県の特産品である桜島大根が血管をしなやかに収縮させる作用を持つことが明らかになった。

nitric oxide, vascular endothelial function, radish

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3B04a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B04 会場

緑茶の新用途開発に向けた茶葉油の基礎研究

Analysis of the tea leaf oil for the development of new and useful application of green tea

○若松 美里[1]、加治屋 勝子[2]、南 雄二[2]([1]鹿児島大院農、[2]鹿児島大農)
○Misato WAKAMATSU[1], Katsuko KAJIYA[2], Yuji MINAMI[2] ([1]Grad. Sch. Agri. Kagoshima Univ., [2]Kagishima Univ.)

【目的】鹿児島県の緑茶生産量は静岡県に続いて全国第 2 位を誇る。南国の暖かい気候を利用して 4 月上旬から始まる新茶は日本一早い新茶として有名である。また、早生から晩生品種まで多様な品種を栽培している。しかし近年、消費者の緑茶(リーフ茶)離れが進み、消費量が低迷している。そのため我々は、消費量増大のため緑茶の新しい用途開発を目指した様々な研究を行っている。その中から、秋冬番茶(収穫期の遅い緑茶)の高付加価値化に繋げる新たな試みについて報告する。緑茶の中でも、秋冬番茶は品質の低下や、茶園管理の手間に比べて収益性が悪いことが問題となっていた。そこで、本研究では秋冬番茶の有効利用として茶葉から抽出される茶葉油の評価を試みた。これまで茶の実から採れる油の利用はあったが、茶葉を原料とした油の分析は前例がない。
【材料と方法】茶葉(やぶきた品種、秋冬番茶)から水蒸気蒸留法により茶葉油を精製した。蒸留物は真空凍結乾燥処理し、ジエチルエーテルに溶かして回収後、濃縮遠心することで回収率を算出した。これにて回収した茶葉油を評価サンプルとした。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて茶葉油に含まれるカテキン類とカフェインの含有量及び脂肪酸組成の測定を行った。脂肪酸分析は 2-ニトロフェニルヒドラジン(NPH)ラベル化法を用いた。また、茶葉油の血管機能に対する影響を調べるため血管内皮細胞に与えることが出来る茶葉油の濃度決定をテトラゾリウム塩(WST)法による細胞毒性試験にて行った。血管内皮機能は一酸化窒素(NO)産生を指標とし、測定法が確立されている亜硝酸イオンの濃度から評価した。血液運搬される食品成分は血管の最も内側にある内皮細胞層を透過して平滑筋に作用することになるため茶葉油の血管内皮細胞層透過性を測定した。
【結果と考察】使用する茶葉の量や蒸留時間の検討を行い、茶葉から油を精製することに成功した。精製した茶葉油には緑茶浸出液と同じようにカテキン類とカフェインが微量ではあるが確認されたが、緑茶浸出液には見られない成分も確認できた。また、6 種の脂肪酸を含んでいることも確認でき、植物油脂類の脂肪酸組成と比較して飽和脂肪酸の割合が高かった。血管内皮細胞毒性試験の結果、茶葉油には細胞に対する致命的な毒性はみられなかったが、NO を増加させる働きもみられなかった。さらに、茶葉油の血管内皮細胞透過を確認できたため、正常な血管機能(伸び縮み)に直接寄与している血管平滑筋細胞に対する収縮・弛緩効果についても評価した。
　本研究により、これまで収益性の悪かった秋冬番茶の有効利用のひとつとしての茶葉油の価値発見につながったと考えられる。

green tea, oil, fatty acid

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3B04a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B04 会場

Na^+/グルコース共輸送担体 1 を阻害する野菜成分の探索および解析

Search and analysis for vegetable components that inhibit sodium-glucose cotransporter 1

○鈴木 大斗[1]、吉田 和敬[2]、相澤 宏一[2]、菅沼 大行[2]、薩 秀夫[3]([1]前工大院・工、[2]カゴメ株式会社イノベーション本部、[3]前工大・工)
○Hiroto SUZUKI[1], Kazutaka YOSHIDA[2], Koichi AIZAWA[2], Hiroyuki SUGANUMA[2], Hideo SATSU[3] ([1]Dept. of Biotech., Maebashi Institute of Technology, [2]Innovation Division, KAGOME CO., LTD., [3]Maebashi Institute of Technology)

【目的】糖尿病はⅠ型とⅡ型に分類され、糖尿病患者の約 95%がⅡ型糖尿病であるとされる。Ⅱ型糖尿病の発症には遺伝的要因に加え環境的要因が大きく関係しており、その要因の一つに食後の血中グルコース濃度の急激な上昇が挙げられる。食事により摂取されるグルコースの多くは、腸管上皮細胞管腔側に発現する Na^+/グルコース共輸送担体 1(SGLT1)を介して体内に吸収されることから、SGLT1 を穏やかに阻害することで血中グルコース濃度の急激な上昇を抑制し、Ⅱ型糖尿病などの予防・改善が期待される。これまでの研究で演者らは、ヒト SGLT1 遺伝子を CHO 細胞に安定的に導入したヒト SGLT1 高発現細胞株を樹立し、 *in vitro* SGLT1 活性評価系を構築した。本研究では野菜成分に注目して、野菜抽出物が SGLT1 活性に与える影響を解析し、さらに SGLT1 活性に影響を与えている野菜成分の探索を行った。
【方法】ヒト SGLT1 高発現細胞株を 24-well plate に播種し、24 時間培養をした。グルコースのアナログである 2-デオキシグルコース(2DG)とともに野菜抽出物や野菜成分を添加し、37℃で一定時間インキュベートした。その後細胞を可溶化し、酵素法を用いて蛍光強度および化学発光強度を測定し 2DG 取込量を算出した。
【結果】市販の野菜ジュースのヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が 2DG 取込活性に与える影響を検討した結果、両抽出物とも SGLT1 活性阻害作用を有することを見出した。さらに、野菜ジュースに含まれる主な野菜 6 種類のヘキサン抽出物が SGLT1 活性阻害作用を有することが示唆された。そこで、野菜のヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物に含まれると予想される脂肪酸やポリフェノール類を用いて、SGLT1 活性に与える影響について検討をした。その結果、ケルセチンなどが SGLT1 活性阻害作用を有することを見出した。また、*in vivo* 評価系としてマウスを用いた経口糖負荷試験を行い、トマトのヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物がマウスの血糖値上昇に与える影響を検討した結果、両抽出物とも血糖値の上昇を抑制する傾向がみられた。これらの結果から、野菜のヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物に含まれる成分がヒト SGLT1 活性阻害作用を有することが示唆された。現在、野菜のヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物による SGLT1 活性阻害メカニズムの解析を進めている。

SGLT1, vegetable components, polyphenol

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3B04a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B04 会場

ニンニク成分アリシンおよびその類似物質がラット大腸陰イオン輸送に及ぼす効果の検討
Effects of allicin and its analogues on anion transport in the rat colon
○土谷 庸[1]、川俣 幸一[2] ([1]東北女子大、[2]東北生活文化大)
○Yo Tsuchiya[1], Koichi Kawamata[2] ([1]Tohoku Women's College, [2]Tohoku Seikatsu Bunka Univ.)

【序論】
ニンニク成分アリシンは腸管運動調節作用を持つ事が知られる。これまで本研究室では、アリシンが大腸クロライドイオン輸送を活性化する事を確認し、その作用がワサビ受容体 TRPA1 を介した機構であることを明らかにした。その後の研究で、アリシンがクロライド以外の陰イオン分泌を活性化するのか、およびアリシンの類似物質であるアリインや S-アリル-L-システインが同様の作用を持つかどうかの検討を行った。
【方法】
ラット大腸を摘出し、大腸筋層および漿膜を剥離した大腸粘膜標本を作製した。粘膜標本を Ussing チャンバーに装着後、KCl 寒天電極を腸管標本の粘膜側と血管側にセットし、カロメル電極を通じて高感度 DC 記録計に接続して腸管膜電位差（ΔPD）を経時的に記録した。
【結果および考察】
①アリシンがクロライドイオン以外の大腸陰イオン分泌に及ぼす効果の検討
大腸粘膜標本の血管側にアリシン 30μM を投与すると、ΔPD の正側上昇がみられた。この ΔPD 上昇はクロライドイオン輸送体である Na-K-2Cl 共輸送体阻害剤のブメタニド前投与、もしくは無クロライドイオン溶液中での培養により抑制されたが、その抑制は完全ではなかった。そこで溶液中から重炭酸イオンを除いた HEPES 溶液にブメタニド前投与した条件下でアリシン 30μM を投与すると、ΔPD 上昇はほぼ完全に抑制された。この結果は、アリシンは大腸クロライドイオン輸送に加えて弱アルカリ性の重炭酸イオン分泌も活性化している事を示唆している。
②アリシン類似物質が大腸イオン輸送に及ぼす効果の検討
アリシンの前駆体物質であるアリイン、および熟成ニンニク成分である S-アリル-L-システインが、アリシン同様に大腸イオン輸送活性化作用を持つかどうかを検討した。それぞれの物質を大腸粘膜血管側および管腔側に 30μM 投与しても、ΔPD 上昇は観察されなかった。またアリイン、もしくは S-アリル-L-システイン投与後にアリシン 30μM を投与した場合、アリシン単独投与時と比較して ΔPD 上昇の規模に差は見られなかった。この結果は、アリイン、S-アリル-L-システインともに少なくとも大腸イオン輸送活性化作用を持たないが、アリシンによるクロライドイオンおよび重炭酸イオン分泌活性化はこれらの類似物質によって影響されない事を示唆している。

Allicin, colon, anion transport

発表責任者：土谷庸（yo58102001@yahoo.co.jp）

講演番号：3B04a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B04 会場

熱殺菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 投与によるマウス糞便排泄量の増加

Heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 increase the volume of stool in mice.

○三原 敏敬[1]、鹿毛 菜央[2]、芳崎 奏[2]、熊谷 武久[1]、城 斗志夫[2]、原 崇[2]([1]亀田製菓（株）、[2]新潟大農)
○Toshihiro MIHARA[1], Nao KAGE[2], Kana YOSHIZAKI[2], Takehisa KUMAGAI[1], Toshio JOH[2], Takashi HARA[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd, [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 (LC327) は玄米から単離された乳酸菌である。加熱殺菌した LC327 の摂取により、ヒトにおける排便量および回数の増加を示す調査結果 [1)]が得られている。また、熱殺菌 LC327 を経口投与したマウスにおいて、腸の蠕動運動を促進するセロトニンの腸管レベルが上昇する結果 [2, 3)]を報告した。本研究では、マウスの糞便排泄に及ぼす熱殺菌 LC327 の影響について、基礎的な検討を実施した。

【方法】BALB/c マウス(♂, 8 週齢)をコンベンショナル環境で飼育し、LC327(1×10^{12} CFU/g 相当)の熱殺菌乾燥粉末を、0.1%(w/w)で混餌して自由摂取させた。定期的に、単位時間当たりの排便量、糞便の水分含量、赤色色素カルミンを指標とした消化管通過時間、大腸ビーズ排出時間を測定した。また、水分子を選択的に透過させるアクアポリン 3(AQP3)に着目し、大腸組織における AQP3 発現レベルについて蛍光免疫組織染色法と定量的 RT-PCR 法により評価した。

【結果】飼育経過 10 日目前後に 0.1%熱殺菌 LC327 投与群マウスでは排便量の増加が確認され始め、飼育 21 日目に、対照群と比較し、0.1%熱殺菌 LC327 投与群マウスの排便量(糞便重量・粒数)および糞便の水分含量が有意に増加した。また、0.1%熱殺菌 LC327 投与群マウスは、大腸ビーズ排出時間が対照群のそれより有意に短縮された。以上の結果より、熱殺菌 LC327 の経口摂取によりマウスの糞便排泄が促進することが確認された。さらに、RT-PCR および蛍光免疫組織染色の結果から大腸組織における AQP3 発現レベル低下が確認された。この AQP3 発現レベルの低下により、糞便中の水分が大腸壁から吸収されるのが抑制され、便の軟化に資すると推察される。

1) 熊谷ら, 食品工業, 52(6), 26-31 (2009).
2) 三原ら, 日本農芸化学会 2016 大会.
3) 三原ら, 日本食品科学工学会 64 回大会.

Lactobacillus casei subsp. *casei* 327, stool volume, bowel movement

講演番号：3B04a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B04 会場

Lactobacillus casei subsp. *casei* 327 加熱殺菌体摂取が健常成人の排便に与える影響
Effect of heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 intake on defecation in healthy volunteers

○齊藤 雄飛[1]、沖 守[2]、熊谷 武久[1] ([1]亀田製菓株式会社、[2]医療法人社団成守会 成守会クリニック)
○Yuhi SAITO[1], Mamoru OKI[2], Takehisa KUMAGAI[1] ([1]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [2]Seishukai Clinic)

【目的】演者らはこれまでに、玄米から単離した乳酸菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327（LC327）の加熱殺菌体 50 mg（生菌換算で 1×10^{11} CFU 相当）の摂取が、ヒトの便通改善効果を有することを前後比較研究で明らかにした [1)]。また LC327 加熱殺菌体の摂取により肌が乾燥しやすい女性の肌を改善することを報告した [2,3)]。本研究では、より少量での整腸効果を検証するために、LC327 加熱殺菌体 25 mg（生菌換算で 5×10^{10} CFU 相当）の摂取が排便回数が少なめの健常成人の排便に与える影響をランダム化比較試験で調査した。

【方法】事前検査および摂取前検査を行った後、普段の排便回数が 1 週間に 3～5 回程度の健常成人男女 104 名（各群 52 名）を対象として、ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を行った。乳酸菌含有錠（加熱殺菌体 25 mg 含有）もしくはプラセボ錠を 2 週間継続摂取させた。主要評価項目は排便回数、排便量とし、副次評価項目は排便日数、便性状（形状、色、におい、排便後の感覚）とした。排便回数、排便量、排便日数は、摂取期の実測値および摂取前からの変化量を群間比較した。

【結果】全被験者 104 名全員が研究スケジュールを終了したが、事前に定めた解析除外基準に該当した 9 名を除いた 95 名で有効性解析を実施した。排便回数では、プラセボ摂取群より乳酸菌摂取群の方が有意な改善が実測値および変化量でみられた。排便量では、実測値では有意な差はみられなかったが、変化量で有意な改善がみられた。排便日数では、変化量および実測値で有意な改善がみられた。便性状では有意な改善効果はみられなかった。以上の結果から、LC327 加熱殺菌体の継続摂取により、排便回数が少なめの健常成人の排便を改善することが示唆された。

1) 熊谷ら：食品工業、52 (6)、26 (2009)
2) Saito *et al.*: Bioscience of Microbiota, Food and Health, 36 (3), 111 (2017)
3) 熊谷ら：薬理と治療、45 (8), 1295 (2017)

Lactobacillus casei, defecation, healthy volunteers

講演番号：3B04a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B04 会場

小麦ブランとバーリーマックスの同時摂取による日本人の腸内環境に及ぼす相乗効果の検討：二重盲検並行群間試験
Combined effect of Wheat Bran and BarleyMax on the fecal microbiota and colonic conditions of healthy adult Japanese: Double-blind, parallel-group trial.
○青江 誠一郎[1]、中村 史子[2]、藤原 優[2] ([1]大妻女子大学家政学部、[2]CPCC 株式会社)
○Seiichiro Aoe[1], Fumiko Nakamura[2], Fujiwara Suguru[2] ([1]Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, [2]CPCC Co., Ltd.)

【目的】食物繊維の摂取は腸内発酵を促進し、腸内細菌叢の乱れを改善することが期待されているが、どのような性質の食物繊維をどのような組み合わせで摂取すべきかはまだエビデンスが少ない。本試験では、健康な日本人を対象とし、小麦ブラン（WB）とバーリーマックス（BM）の併用効果を評価するため、両者を同時または単独で 4 週間摂取した場合の、腸内細菌叢およびその代謝産物の変化を評価した。
【方法】試験は、同意の得られた 20 歳以上 65 歳未満、排便回数が週 5 回以下、かつ事前検査での食物繊維摂取量が 1 日 12g 以下の健康な男女 60 名で行った。60 名を 15 名ずつ WB・BM 無添加群、WB 単独群、BM 単独群、WB・BM 併用群の 4 群に男女バランスが等しくなるようにランダムに分けた。試験食品は、40g のバー状食品を 1 日 2 回、主食の代わりとして 1 回 1 本の試験食品を摂取した。WB と BM を含まない食品はセルロース 4.5g/1 食を、併用食品は、WB と BM をそれぞれ 6g+6g/1 食、単独群は WB または BM を 6g/1 食とし、全ての試験食品の総食物繊維量が等しくなるようにセルロースを配合して調整した。前観察期間は 2 週間とし、試験食品を 4 週間摂取した。試験前と 4 週間後に便検体の採取、血液検査、尿検査を実施した。採取した便検体について、腸内細菌叢遺伝子の 16S メタゲノム解析を行った。また、糞便中の有機酸および糞便中の腐敗物質濃度（インドール、フェノール、アンモニア、スカトール）を分析した。本分析は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。WB と BM それぞれの単独作用、あるいは両者の交互作用による効果について二元配置分散分析により解析した。
【結果と考察】試験食品摂取 4 週間目で、WB と BM の交互作用により腸内細菌の門レベルで *Bacteroidetes* 門、属レベルで *Bacteroides* 属の腸内細菌全体に対する占有率が有意に増加した。この結果を反映して、WB と BM の交互作用により *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門の比率（FB 比）が有意に低下した。本結果より、WB と BM の同時摂取は腸内環境改善に寄与したことが示唆された。糞便中の有機酸、糞便中の毒素物質の結果より、WB の主効果によって、酢酸、n-酪酸、総有機酸の濃度上昇が認められ、p-クレゾールと総腐敗物質（アンモニアを除く腐敗物質の総和）の濃度低下が認められた。本結果より、WB は単独で発酵を促進して、有機酸の産生を高め、腐敗物質の産生を抑制していることが示唆された。
　以上の結果、小麦ブランは腸内代謝物を改善し、バーリーマックスと併用することにより相乗的に腸内細菌叢を改善することが健常な日本人男女で示された。

wheat bran, barleymax, fecal microbiota

発表責任者：青江　誠一郎（s-aoe@otsuma.ac.jp）

講演番号：3B04p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B04 会場

Peptides derived from egg yolk (Hair growth Peptide, HGP®) are responsible to improve hair growth via induction of VEGF expression

○Caroline Donzeli Pereira[1], Toshio Nakamura[1], Kyungho Park[2], Yoshikazu Uchida[1], Noriko Horie[1], Mujo Kim[1], Satoshi Itami[3] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, [3]Department of Regenerative Dermatology, Osaka University)

Androgenic alopecia and telogen effluvium contributes to the majority of alopecia cases. Increases in testosterone production cause androgenic alopecia in males, while an imbalance in estrogen-testosterone ratio likely contributes to female pattern hair loss (FPHL). Indeed, inhibition of testosterone production is a potent treatment for androgenic alopecia in males, but it is not effective in both androgenic alopecia and in telogen effluvium. Minoxidil, a drug approved by U. S. Food and Drug Administration (FDA) for alopecia treatment, stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) production as well as vascularization and improves hair growth in females. While, prolonged usage can cause some adverse effects like skin rash and/or facial hair growth. In this sense, safe and potent agents are needed to treat alopecia. Whereas hairs are developed after birth in mammalian species, hairs develop rapidly between hatching day 12 and 13 in precocial birds. Therefore, we hypothesized that the hen egg contains a hair growth key factor. We here demonstrated that peptides derived from egg yolk not only stimulate VEGF production, but also induce human hair follicle dermal papilla cell growth. We characterized that these peptides derived from egg yolk induce VEGF expression through IGF-1 receptor activation-induced VEGF production via PI3K activation followed by a transcription factor, HIF-1α. We have given the name, hair growth peptide (HGP) to this water soluble egg yolk peptide. Finally, we demonstrated HGP is capable to enhance murine hair growth and improve hair growth of FPHL.

Egg yolk peptide, Alopecia, VEGF

講演番号：3B04p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B04 会場

Imidazole dipeptide homeostasis in heart is controlled by vitamin B6 through maintenance of β-alanine and γ-aminobutyric acid levels

○Thanutchaporn KUMRUNGSEE, Dwi Eva NIRMAGUSTINA, Noriyuki YANAKA, Norihisa KATO (Hiroshima Univ.)

Vitamin B6 is a co-factor in more than 150 enzymatic reactions, mainly in amino acid metabolism. Many studies have suggested that a low dietary intake of vitamin B6 (B6) is associated with a high risk of mortality from cardiovascular disease or heart disease and supplementation of this vitamin reduces a risk of heart disease. However, many recent studies have indicated that the link between B6 and heart disease is controversial, and the underlying mechanisms are not fully understood. Thus, the objective of this study was to examine the effect of B6 levels on metabolites in heart tissues of rats.

Sprague Dawley rats were divided into three groups (10 rats/group) receiving a normal diet containing a B6 deficient level (1 mg pyridoxine (PN) HCl/kg diet), a B6 recommended level (7 mg PN HCl/kg diet), or a B6 supplement level (35 mg PN HCl/kg diet). After a feeding period of 6 weeks, rats were sacrificed, and heart tissues were subjected to CE-TOFMS and HPLC for assessing metabolites and enzyme activity in heart.

Over 500 detected metabolites, 12 metabolites were found to be significantly different between the B6 deficient group and the B6 recommended and supplement groups. B6 deficiency strikingly decreased the levels of imidazole dipeptides (carnosine, anserine, and homocarnosine) and the dipeptide precursors (β-alanine, 1-methyl histidine, γ-aminobutyric acid (GABA), respectively) by 40-60% ($P < 0.05$) and significantly decreased the levels of serine, alanine, leucine, isoleucine, and valine (the precursors of β-alanine and GABA) by 10-30% ($P < 0.05$). Ornithine was the only amino acid that its level higher by 30% in the B6 deficient group ($P<0.005$). We found that glutamate decarboxylase activity, but not aspartate decarboxylase, was significant lower in the B6 deficient group (-35%, $P < 0.05$).

Since carnosine synthase responsible for formation of the imidazole dipeptides is not a B6-dependent enzyme, B6 may stimulate this enzyme through increasing levels of the enzyme substrates, GABA and β-alanine, by activating enzymes involved in productions of the amino acids that are precursors of GABA and β-alanine and by directly activating glutamate decarboxylase which is a rate-limiting step in the formation of GABA. Since aspartate decarboxylase activity was not different between the three groups, it is interesting to check whether B6 plays a key role in stimulating ornithine decarboxylase, which is responsible for converting ornithine to β-alanine. In this study, we propose that B6 may exert heart protective effects through controlling the enzymes that regulates the levels of amino acids responsible for the formation of β-alanine and GABA, which are the rate-limiting precursors of the imidazole dipeptides, the putative heart-protective compounds.

Vitamin B6, Imidazole peptides, Heart disease

発表責任者：Thanutchaporn KUMRUNGSEE（kumrung@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3B04p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B04 会場

MRM 法を用いた高感度タンパク質定量システムによる食品機能性評価法の確立

Establishment of evaluation for food function by highly sensitive protein quantification system using MRM method

○平山 未央[1]、黒木 勝久[1]、永浜 清子[1]、橋口 拓勇[2]、榊原 陽一[1] ([1]宮大農、[2]宮崎県農試)
○ Mio Hirayama[1], Katsuhisa Kurogi[1], Kiyoko Nagahama[1], Takuyu Hashiguchi[2], Yoichi Sakakibara[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Miyazaki Agric. Res. Inst.)

近年予防医学の観点から機能性食品が注目されており、既存の食品成分の評価とともに、新規成分の探索も重要な課題である。現在、培養細胞を用いた食品成分の評価法は、細胞に食品成分を添加し、変動したタンパク質の量を ELISA 法で測定することが一般的である。ELISA 法は標的タンパク質に特異的な抗体を用いるため、感度とスループットが高いことが特徴である。一方、抗体に依存する検出系が最大の問題点であり、適切な抗体がない場合やロットによって力価が変わる場合には、長期間にわたり継続的な検出を行うことが困難である。タンパク質の定量法としてタンパク質由来の標的ペプチドを定量する方法があり、標的のタンパク質の酵素分解産物を液体クロマトグラフィー(LC)で分離し、質量分析装置(MS)でペプチド固有の質量を計測する。特に標的ペプチドを高感度に特異的に検出する方法として三連四重極型の質量分析装置を用いた SRM/MRM(Selected reaction monitoring/ Multiple Reaction Monitoring)法がある。MRM 法では少ない量のサンプルを使用して一度の測定で多数のペプチドを測定することが可能であるため、タンパク質の変動から評価する食品成分の評価法に応用できる可能性が高い。そこで本研究では質量分析技術によるタンパク質定量法を用いた食品成分の機能性評価法開発を目的とした。

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞への食品成分添加実験は、終濃度でリポ酸（1 mM）、ゲニステイン（60 μM）、ケンフェロール（60 μM）、ケルセチン（60 μM）、BITC（15 μM）で 24 時間処理を行い、可溶化してタンパクサンプルを回収した。回収したタンパク質は還元アルキル化処理後に酵素消化し、生じたペプチド断片に内部標準ペプチドを加え、脱塩後に microLC-MS/MS 解析に供すことで MRM 解析を行った。細胞増殖やアポトーシスに関わり、かつ先行研究で食品成分処理により高いタンパク質発現変動倍率を示した HSP70、 ERK2 などを標的タンパク質とした。発現比較解析は、安定同位体ペプチドのピークエリアを内部標準にし、標的ペプチドのピークエリアを比較・補正することで各食品成分間での標的ペプチドの発現比較を行った。本発表では、コントロール・食品成分処理による発現比較解析の結果と ELISA データとの比較などを報告する。

MRM/SRM, functional food, protein quantification

講演番号：3B04p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B04 会場

鶏足酵素分解物の膝関節痛緩和に関する有効成分の同定及び作用機序の解明

Identification of functional peptide from chicken leg derivative and its mechanism of action for knee pain alleviation

○山田 裕晃、中村 唱乃、中村 紀夫、坂下 真耶、堀江 健二、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○ Hiroaki YAMADA, Utano NAKAMURA, Toshio NAKAMURA, Maya SAKASHITA, Kenji HORIE, Mujo KIM (Pharma foods International Co., Ltd.)

【目的】現在、日本の 65 歳以上人口は 3,000 万人を超え、その 3 人に 1 人は膝に痛みを感じていると報告されている。また、変形性膝関節症の患者数は 700 万人と推定されているが、治療法は対処療法のみであり、効果的な治療薬が存在しない。これまでに我々は鶏足の酵素分解物からヒアルロン酸、軟骨基質の産生を増大させる生理活性画分「ヒアルロン酸産生促進物(HAS-II)」を見出している。さらに、HAS-II はヒト経口摂取試験において膝関節痛の緩和及び予防に効果的である事を示した。本研究では HAS-II の膝関節痛に対する作用機序を解明するため、血漿中 HAS-II 由来ペプチドに着目し、軟骨基質に対する機能性を検討した。

【方法】HAS-II の腸内消化を検討するために、HAS-II の人工消化物を調製した。さらに、HAS-II 由来ペプチドを決定するために HAS-II 人工消化物を LC-MS/MS に供し、*de novo* シーケンス解析を実施した。更に、HAS-II 由来ペプチドの生体内への移行を確認するために、ヒト経口摂取試験を行った。健常人 3 名の被験者に HAS-II 10 g を摂取させ、摂取後 0、60、120 分後に採血し、血漿中の HAS-II 由来ペプチドを LC-MS/MS で検出した。HAS-II 由来ペプチドの軟骨基質への効果を評価するため、血漿中濃度が高値の HAS-II 由来ペプチドを 7 種選択し、500 μM の濃度で軟骨前駆細胞(ATDC5)にそれぞれ添加した。14 日間培養後アルシアンブルー染色液で酸性ムコ多糖を染色した。画像解析ソフト Image J を用いて染色面積を数値化することで酸性ムコ多糖の産生量を評価した。

【結果】HAS-II 人工消化物中から *de novo* シーケンス解析によって 21 種類の HAS-II 由来ペプチドの構造を推定した。HAS-II 経口摂取後の血漿中から HAS-II 由来ペプチドを分析した結果、Pro-Hyp , Leu-Hyp , Pro-Hyp-Gly , Glu-Hyp , Phe-Hyp , Ala-Hyp-Gly , Gly-Hyp 等の 17 種類のペプチドが生体内へ移行していることを確認した。HAS-II 由来ペプチドの軟骨基質への効果を評価するため、血漿中濃度が高い 7 種のペプチドで軟骨基質産生量の評価を行った。7 種のペプチドを ATDC5 にそれぞれ添加し、アルシアンブルー染色を行った結果、Phe-Hyp 添加によってのみ、アルシアンブルー染色面積がコントロールと比べ 217%増加した。従って、Phe-Hyp は酸性ムコ多糖の産生を促すことが示唆された。

以上から HAS-II は経口摂取されることで腸内消化を受け、17 種類のオリゴペプチドが生体内へ移行することが明らかとなった。その中で、HAS-II 由来ペプチドの一つである Phe-Hyp が軟骨基質の酸性ムコ多糖産生を促進させることによって、膝関節痛を緩和させる可能性を初めて見出した。

peptide, osteoarthritis of the knee, food function

講演番号：3B04p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B04 会場

間葉系幹細胞の Wnt3a 誘導性 TCF 転写活性に対する分岐鎖アミノ酸の影響

Influence of branched-chain amino acids to Wnt3a-induced TCF activity of mesenchymal stem cells, ST2

○前西 康太、鬼丸 祐二、田中 牧、細田 明美、金 東浩、佐伯 茂（大阪市大・院生活科学・生体情報）
○Kota MAENISHI, Yuji ONIMARU, Maki TANAKA, Akemi HOSODA, Dong-Ho KIM, Shigeru SAEKI (Osaka City Univ.)

【目的】肝硬変などの慢性肝疾患では、骨粗鬆症の罹患率が高く、骨折リスクが増加していることが報告されている。このような骨代謝異常を伴う慢性肝疾患は肝性骨異栄養症と総称されるが、その発症メカニズムは明確ではない。慢性肝疾患では活性型ビタミン D 産生の低下に伴うカルシウム代謝の異常により、骨粗鬆症が生じるとの考え方があるが、私たちは、慢性肝疾患で観察される血漿中の分岐鎖アミノ酸（Val、Leu、Ile）濃度の低下が原因の一つではないかと考えた。すなわち、骨量は骨形成と骨吸収とのバランスによって決定されるが、分岐鎖アミノ酸の低下は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制するために骨代謝異常が発症すると考えた。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化は、Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の下流に位置する転写因子 T cell factor（TCF）の活性化によって誘導されることが知られている。そこで本研究では、分岐鎖アミノ酸の欠乏が TCF 転写活性に与える影響について検討した。

【結果と考察】先ず、マウス骨髄由来間葉系幹細胞である ST2 細胞を、10%FBS/DMEM 培地で培養した後に、無血清 DMEM 培地、Val、Leu、Ile の何れかを欠乏する無血清 DMEM 培地で 12 時間培養した時の細胞生存率に、実験群間で有意差がないことを確認した。次いで、ST2 細胞を 10%FBS/DMEM 培地で培養した後に、Wnt3a/無血清 DMEM 培地、Val、Leu、Ile の何れかを欠乏する Wnt3a/無血清 DMEM 培地で 12 時間培養した時の TCF 転写活性をルシフェラーゼアッセイ法によって測定した。TCF 転写活性は、Wnt3a によって著しく上昇した。Wnt3a による TCF 転写活性の上昇は、Val または Ile 欠乏によって抑制されたが、Leu 欠乏によって抑制されなかった。以上より、分岐鎖アミノ酸は TCF 転写活性に影響を与えるが、その影響は分岐鎖アミノ酸の種類によって異なることを明らかにした。現在、それらの作用機構について検討を行っている。

Wnt, TCF

講演番号：3B04p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B04 会場

ヒト肝由来 HepG2 細胞におけるタウリンによる遺伝子発現制御機構の解析

Analysis of regulatory mechanism of taurine-induced gene expression in HepG2 cells.

○和多利 研二[1]、井前 正人[2]、薩 秀夫[3]([1]前工大院・工、[2]大正製薬（株)、[3]前工大・工)
○ Kenji Watari[1], Masato Imae[2], Hideo Satsu[3] ([1]Dept. of Biotech., Maebashi Institute of Technology, [2]Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., [3]Maebashi Institute of Technology)

【目的】タウリンはタンパク質合成に関与しない遊離アミノ酸で、魚介類に多く含まれている。タウリンは生体内で抗酸化・抗炎症などの多彩な生理作用を示すことが報告されている一方、タウリンの分子・遺伝子レベルでの解析がほとんどなされていないことから生体内での作用機序に不明な点の多い食品因子でもある。演者らはこれまでに、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞及びヒト肝癌由来 HepG2 細胞においてタウリンが thioredoxin interacting protein(TXNIP)やがん抑制因子 p16 などの mRNA 発現を亢進することを見出してきた。本研究では、タウリンによる遺伝子発現制御の作用機序についてさらに解析を進めることとした。
【方法】HepG2 細胞を播種し培養した後に、タウリンを添加してインキュベートした。その後 RNA を回収して real-time PCR にて mRNA 発現レベルを検討した。また、同様にタウリン添加後の HepG2 細胞よりタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法によりタンパクレベルの発現変化についても検討した。またヒト TXNIP のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを構築して細胞に遺伝子導入した。細胞をタウリンを含んだ培地でインキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。
【結果・考察】タウリンを含んだ培地で HepG2 細胞をインキュベートした後、p16 の mRNA 発現量及びタンパク質発現量を検討したところ､添加したタウリン濃度依存的に p16 の発現量の増加がみられた。この増加はヒポタウリンやβアラニン、GABA などタウリン構造類似体ではみられず、極めてタウリン特異的であった。タウリンによる p16 発現亢進に対する MAP キナーゼの関与を各種阻害剤を用いて検討したところ、ERK 経路阻害剤である PD98059 によってタウリンによる p16mRNA 発現亢進は有意に抑制された。そこで実際に ERK が関与しているかウェスタンブロット法を用いて検討したところ、タウリン添加によってリン酸化型 ERK の増加が確認され､タウリンによる ERK の活性化が明らかとなった。またレポーターアッセイの結果、タウリンは TXNIP を転写レベルで制御していることが示唆された。さらに TXNIP のプロモーター上でタウリンによる転写活性亢進に関与が示唆される転写因子Ｘ(仮称)に注目した。転写因子Ｘを RNAi 法を用いてノックダウンした結果、ノックダウンによってタウリンによる p16 の mRNA 発現亢進は有意に抑制され、タウリンによる p16 発現制御にはこの転写因子が関与していることが示唆された。

taurine, HepG2, p16

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3B04p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B04 会場

エゴマおよびエゴマ発酵産物中成分によるコラーゲン産生メカニズムの解析
Analysis of collagen production mechanism by *Perilla frutescens* var. frutescens (Egoma) and its fermentation products

○竹内 萌恵[1]、加島 隆洋[2]、鈴木 寿[2]、北口 公司[3]、矢部 富雄[3,4] ([1]岐阜大院・自然科学、[2]岐阜県産業技術センター、[3]岐阜大・応生、[4]生命の鎖統合研究センター)
○ Moe TAKEUCHI[1], Takahiro KASHIMA[2], Hisashi SUZUKI[2], Kohji KITAGUCHI[3], Tomio YABE[3,4] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. Natural Science and Technology, [2]Industrial Technology Center, Gifu prefectural Government, [3]Gifu Univ., Dept. Appl. Life Sci, [4]G-CHAIN)

【目的】
エゴマ（*Perilla frutescens* var. *frutescens*）は種子から抽出した油を古くから利用してきた油糧作物の一種である。その油は健康増進に対する効果で注目され，食用油としての利用が高まっている。一方で，搾油後の残渣の多くは廃棄されており，その利用方法の一つとして発酵技術に注目した。また，本研究では健康長寿を目指す上で重要なコラーゲンに着目し，老化に伴って減少するコラーゲン量の維持に作用する食品素材としてエゴマを検討した。これまでに我々は，エゴマ残渣がマウス線維芽細胞(L-M 細胞)のコラーゲン産生を促進する作用を報告しているが，その発酵産物で同様の作用があるのかは確認されていない。そこで本研究では，エゴマ残渣発酵産物にもコラーゲン産生促進作用が存在するのかを調査した後，そのメカニズムを解明することを目的とした。
【方法】
各エゴマ種子搾油後残渣(未発酵エゴマ，麦麹発酵エゴマ，泡盛麹発酵エゴマ)を用いて熱水抽出(121℃，1 h)をした。吸引濾過後，濾液に対してヘキサンで十分脱脂をし，凍結乾燥によって得られた粉末をエゴマ熱水抽出物とした。前培養した L-M 細胞に各エゴマ熱水抽出物を混合した培地を添加し，WST 法によって細胞に対する毒性を調べた。また，各試料を各時間添加して L-M 細胞を培養した上清を回収し，SCA 法によりコラーゲン量を測定した。さらに，コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性を測定し，各試料がその活性に影響を与えるのかを検討した。
【結果】
WST 法により各試料の L-M 細胞に対する毒性を調査し，生存率 80%以上の濃度範囲でコラーゲン産生量を測定した。添加後 48 時間で全てのエゴマでコラーゲン産生促進作用が確認され，未発酵エゴマおよび泡盛麹発酵エゴマで，麦麹発酵エゴマと比較してより低濃度でその作用を示した。また，試料添加後 48 時間でのコラーゲン産生量を調査すると，未発酵エゴマは全ての時間(3, 12 18 24 48 h)において時間依存的なコラーゲン増加が確認されたのに対し，発酵させた 2 種のエゴマは主に後期のコラーゲン産生を促進することが示唆された。続いて，各試料が MMP の活性に与える影響を調査したところ，全てのエゴマに MMP 阻害活性があることが確認された。しかし，その阻害率は未発酵エゴマが最も高かった。以上の結果より，エゴマ残渣は発酵後もコラーゲン産生促進作用が残存する可能性が示された。

Perilla frutescens var. frutescens, collagen, fermentation products

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B04p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B04 会場

スケトウダラタンパク質の筋量増加効果の作用成分の探索
Elucidation of effective composition of Alaska Pollack for muscle-increasing effect
○内田 健志[1]、宇都宮 さち[2]、上東 亮太[2]、澤井 真梨子[2]、韓 力[1]、藤谷 美菜[2]、速水 耕介[3]、岡田 晋治[4]、岸田 太郎[2] ([1]日本水産株式会社 生活機能研、[2]愛媛学院農、[3]横浜薬大・薬・食化学、[4]東大院・農生科・機能性食品ゲノミクス)
○Kenji UCHIDA[1], Sachi UTSUNOMIYA[2], Ryota UEHIGASHI[2], Mariko SAWAI[2], Li HAN[1], Mina FUJITANI[2], Kousuke HAYAMIZU[3], Shinji OKADA[4], Taro KISHIDA[2] ([1]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [2]Ehime Univ., [3]Yokohama Univ. of Pharmacy, [4]Tokyo Univ.)

【背景】我々は、これまでに、AIN-93G 基本飼料のカゼイン（Cas）をスケトウダラタンパク質（APP）に置換した飼料の摂餌によって、ラットの筋量増加作用を確認してきた。APP の組成に基づくアミノ酸混合（A-APP）置換した飼料では筋量の増加は見られないこと（試験１）より、APP のアミノ酸組成によるものではなく、筋増加作用を引き起こす有効成分が APP 内に存在することを示唆されたため、本研究では、APP 内の有効成分同定を目的として、APP 分画物の筋量増加作用について報告する。
【試験】試験１：AIN-93G 基本飼料の Cas を APP、A-APP、大豆に置換して 7 日間摂餌し、腓腹筋重量を比較した。試験２：Cas、APP を 1000 mg/kg、333mg/kg を一日 1 回 3 日間強制経口投与し、腓腹筋重量を比較した。試験３：APP を分画し、ミオシン、コラーゲンを有するミオシン画分と、有しないアクチン画分に分画し、APP333 mg/kgの用量に対し収率換算したミオシン画分、アクチン画分を 3 日間強制経口投与し、腓腹筋重量を比較した。
【結果】試験１：APP のみに腓腹筋増加効果が確認された。試験２：APP 1000mg/kg 及び 333mg/kg 投与群において腓腹筋重量の増加を確認した。試験３：APP とミオシン画分において腓腹筋重量の増加が確認された。
【考察】A-APP の摂餌によって腓腹筋増加効果がなかったこと（試験１）、APP 経口投与では 333mg/kg の低用量でも効果があったこと（試験２）から、APP の筋肉増強作用は、そのアミノ酸組成によるものではなく、APP 中に有効成分が存在することが示唆された。また、分画物の評価（試験３）により、アクチン画分に含まれていないミオシン、または、コラーゲンが有効成分であることが示唆された。
本研究の一部は、内閣府 SIP（戦略的イノベーション創造プログラム研究課題番号 14533567)「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研支援センター委託研究）によって実施された。

Alaska Pollack protein, muscle-increasing, effective composition

発表責任者：内田健志（kenji_uchida@nissui.co.jp）

講演番号：3B05a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B05 会場

小胞体ストレスの緩和を介した緑藻カロテノイドの抗炎症作用
Siphonxanthin, a green algal carotenoid, inhibits AGEs-induced inflammation via modulation of ER stress
○真鍋 祐樹、瀧井 靖歩、菅原 達也（京都大院農）
○Yuki MANABE, Yasuho TAKII, Tatsuya SUGAWARA (Kyoto Univ.)

【目的】近年、糖尿病合併症の発症や進行に関わる因子として、終末糖化産物（Advanced Glycation End Products, AGEs）が注目されている。AGEs は、グルコースなどの還元糖やその代謝物のカルボニル基と、タンパク質などのアミノ基の非酵素的反応により生成し、生体内においては、糖尿病による持続的な高血糖状態によって、その生成が促進される。実際、糖尿病患者の血中や糖尿病性腎障害の病変部、アテローム性動脈硬化症のプラークなどに、AGEs が蓄積していることが報告されている。また AGEs は炎症反応などの様々な細胞応答を誘導し、その結果、糖尿病合併症の発症や進行につながると考えられている。一方、天然の脂溶性色素であるカロテノイドは、様々な炎症反応を抑制することで知られており、演者らも海洋生物に由来するカロテノイドを中心に、その抗炎症作用を報告してきた。そこで本研究では、AGEs によって誘導される炎症反応に対し、抑制的に働くカロテノイドを探索すること、さらに、その作用メカニズムを解明することを目的とした。
【方法】AGEs はマウスマクロファージ細胞株 RAW264 おいて、一酸化窒素の産生を誘導することが知られている。そこで、これを指標として、AGEs によって誘導される炎症反応を抑制するカロテノイドを探索した。抑制作用が認められたカロテノイドについて、炎症関連遺伝子の発現レベルや NF-κB の活性化レベルを評価することによって、その作用メカニズムの解明を試みた。
【結果と考察】ミルやクビレズタ（海ぶどう）に含まれるカロテノイドのシフォナキサンチンに、AGEs 刺激後の RAW264 細胞における一酸化窒素産生の抑制作用を見出した。またシフォナキサンチンは、IL-1β や TNF-α、IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現量を低下させ、小胞体ストレスのマーカーである XBP-1 mRNA のスプライシングアイソフォームの発現レベルをも減少させた。同様の結果は、RAW264 細胞のみならず、ヒト臍帯静脈内皮細胞でも認められた。さらに、レポータージーンアッセイによって、シフォナキサンチンや小胞体ストレス緩和剤であるタウロウルソデオキシコール酸ナトリウムが、AGEs によって誘導される NF-κB の活性化を抑制することを見出した。以上の結果より、シフォナキサンチンは、小胞体ストレスを緩和することによって、AGEs 誘導性の炎症反応を抑制することが示された。

Advanced glycarion end products, Carotenoids, ER stress

発表責任者：真鍋　祐樹（yuukim@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B05a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B05 会場

脂肪酸アミドによる抗炎症活性の解析

Anti-inflammatory activity of fatty acid amide

○柴田 貴広[1]、岡本 拓也[1]、吉武 淳[2]、内田 浩二[3]([1]名大院・生命農、[2]名大・未来社会、[3]東大院・農生科)
○Takahiro SHIBATA[1], Takuya OKAMOTO[1], Jun YOSHITAKE[2], Koji UCHIDA[3] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

脂質は、細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源としての役割を持つ重要な生体分子であるだけでなく、様々な生理活性を有した脂質メディエーターに変換されることが知られている。近年、脂肪酸のカルボキシ基 (-COOH) が第一級アミド基 (-$CONH_2$) へと変換された脂肪酸アミド化合物の一種が、新規の脂質メディエーターとして様々な生理活性を有することが報告され注目されている。我々は昨年度本大会において、質量分析装置を用いた脂肪酸アミド類の高感度検出・定量法について報告した。また、リポ多糖 (LPS) 投与マウス血漿中の脂肪酸アミド濃度が顕著に減少することを明らかにしている。そこで今回は、脂肪酸アミドの中でも特にオレイン酸アミド (オレアミド) に注目し、in vivo および in vitro における炎症抑制効果について検討を行ったので、その結果を報告する。

【方法・結果】

Balb/c マウス (オス 7 週齢) にオレアミド (50 mg/kg B.W.) を経口投与後、 LPS (15 mg/kg B.W.) を投与し、5 日間のマウス生存率を確認した。その結果、コントロールである溶媒投与群と比較して、オレアミド経口投与群では有意に生存率が回復することが明らかとなった。また、LPS 投与 1 時間後に尾静脈より血液を採取し、TNF-α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生量を ELISA 法により評価したところ、オレアミド経口投与群では炎症性サイトカイン産生量が有意に減少していることが明らかとなった。さらに、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて炎症抑制効果の評価を行った。その結果、オレアミドは LPS により誘導される炎症性サイトカイン産生やシクロオキシゲナーゼ 2 などの炎症関連分子の発現を顕著に抑制することが判明した。以上の結果から、オレアミドが抗炎症作用を有することが示唆された。現在、オレアミドによる炎症抑制機構について、培養細胞を用いて解析をしている。

fatty acid amide, inflamamtory, lipid mediator

発表責任者：柴田貴広（shibatat@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B05a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B05 会場

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する植物発酵エキス分画物の効果

Effects of fractionated fermented plant-based extract on colitis induced by dextran sulfate sodium in mice.

○山本 美菜[1]、藤田 瑞貴[1]、村上 允唯[2]、中川 泰輔[2]、本多 奈保子[1]、渡辺 敏郎[1]([1]園田学園女大・食栄、[2]機能性食品開発研究所)
○Mina YAMAMOTO[1], Mizuki FUJITA[1], Nobutada MURAKAMI[2], Taisuke NAKAGAWA[2], Naoko HONDA[1], Toshiro WATANABE[1] ([1]Sonoda Women's Univ., [2]Functional Food Creation Research Inst.)

【目的】マウスにデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液を飲水させると実験的に潰瘍性大腸炎モデルが得られ、このマウスを用いると潰瘍性大腸炎を抑制する食品素材をスクリーニングすることができる。昨年度の本大会では、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに植物発酵エキスを与えると潰瘍性大腸炎の発症を抑制することを報告した(1)。本研究では、植物発酵エキス分画物の潰瘍性大腸炎抑制効果について検討したので報告する。
【方法】植物発酵エキスは、製品「陽命源 GOLD」（㈱機能性食品開発研究所）を用い、それを 50%（w/w）エタノール水を用いて可溶性画分と不溶性画分とに分画した。5 週齢の雄性 BALB/c マウスを 1 群 8 匹となるよう陰性対照群（NCON）、陽性対照群（PCON）、植物発酵エキス群（FPE）、植物発酵エキス可溶性群（SOL）、植物発酵エキス不溶性群（INSOL）の 5 群に分けて自由摂取により評価した。DSS 水は、3%（w/w）濃度とし、7 日間自由飲水させ、体重と飼料摂取量は 2 日おきに測定した。イソフルランにて麻酔後、断頭採血し、解剖は各種臓器を摘出して、それぞれ重量を測定し、大腸の長さを測定した。炎症性サイトカイン（IL-6、TNF-α）および抗炎症性サイトカイン（IL-10、TGF-β1）は ELISA 法により定量した。データは平均値±標準誤差で示し、群間での有意差は統計ソフト「IBM SPSS Statistics 20」を用いて Bonferroni の多重比較検定をおこない、$p<0.05$ を統計学的に有意と判定した。
【結果および考察】大腸の長さは、NCON 群は 8.45±0.39 cm であったが、PCON 群は 5.60±0.13 cm と有意に委縮した。FPE 群は 7.36±0.11 cm と PCON 群と比べて有意に委縮を抑制した。SOL 群および INSOL 群ともに PCON 群と比べて有意に委縮を抑制したが、INSOL 群よりも SOL 群のほうが高い抑制効果を示す傾向がみられた。また炎症性サイトカインである IL-6 および TNF-α は、PCON 群と比べると FPE 群、SOL 群、INSOL 群において有意に抑制し、抗炎症性サイトカインである TGF-β1 は、PCON 群と比べると FPE 群、SOL 群において有意に高値を示した。
以上の結果から、植物発酵エキスは、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して効果を示すことが確認でき、また、植物発酵エキスの分画物では、不溶性画分よりも可溶性画分の方が高い効果を示すことがわかった。
1）山本美菜ほか、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する植物発酵エキスの効果、日本農芸化学会 2017 年度大会（京都）

inflammation, fermentation, dextran sulfate sodium

講演番号：3B05a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B05 会場

抗炎症作用を有するクワ葉成分の探索および解析
Analysis of mulberry leaf components for anti-inflammation
○本田 瑞希[1]、亀井 飛鳥[2]、相田 美緒[3]、薩 秀夫[3]([1]前工大院・工、[2]KISTEC、[3]前工大・工)
○Mizuki HONDA[1], Asuka KAMEI[2], Mio AIDA[3], Hideo SATSU[3] ([1]Dept. of biotech., Maebashi institute of technology, [2]KISTEC, [3]Maebashi institute of technology)

【目的】クワは日本をはじめ東アジアなどで盛んに栽培され、日本では古くから蚕の餌として利用されるとともに健康茶としても飲み継がれてきた。近年クワ葉の持つ健康機能性がさらに注目され、血糖値上昇抑制作用や脂質代謝改善作用、抗炎症作用などが報告されている。一方、演者らはこれまで抗炎症作用を有する食品成分について解析を進め、その結果抗炎症作用が期待される食品成分の作用メカニズムとして、炎症のマスターレギュレーターである転写因子 NFκB 阻害を見出してきた。さらに NFκB に焦点をあて、抗炎症性食品成分の探索系として動物培養細胞を用いて NFκB 転写活性を安定に測定する評価系を構築し、2016 年度の本大会にて報告した。そこで本研究では炎症性疾患の中でも肝炎に注目することとし、先に構築した NFκB 転写活性安定評価系を用いて、クワ葉に含まれるフィトケミカルが NFκB 転写活性に及ぼす影響を検討するとともに、ヒト肝由来モデル細胞を用いてクワ葉に含まれるフィトケミカルが炎症関連分子の発現・産生に及ぼす影響について検討することとした。
【方法】NFκB 依存的な転写活性の安定評価系として、ルシフェラーゼ遺伝子上流に NFκB 応答配列を含むレポーターベクターを HeLa 細胞に安定に遺伝子導入した細胞株を用いた。NFκB 転写活性を亢進することが知られる炎症性サイトカイン TNF-α とクワ葉に含まれるフィトケミカルを同時に細胞に添加し、37℃で 4 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。また NFκB の標的遺伝子として炎症性ケモカインであるインターロイキン 8（IL-8）に注目し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いてクワ葉に含まれるフィトケミカルが IL-8 の mRNA 発現量および分泌量に及ぼす影響を、real-time PCR 法および ELISA 法をそれぞれ用いて解析した。
【結果】クワ葉に含まれる主なフィトケミカルが TNF-α による NFκB 転写活性亢進に及ぼす影響を検討した結果、1-デオキシノジリマイシン（1-DNJ）が TNF-α によって亢進された NFκB 転写活性を有意に抑制することを見出した。さらに、HepG2 細胞に TNF-α と 1-DNJ を同時に添加した後 IL-8 の mRNA 発現量および分泌量を測定した結果、TNF-α による IL-8 mRNA 発現量および分泌量の亢進は 1-DNJ 添加によっていずれも有意に抑制された。以上より、クワ葉成分の一種である 1-DNJ は、TNF-α により亢進される NFκB 転写活性および IL-8 の mRNA 発現・分泌を抑制することが見出された。現在さらに、TNF-α による NFκB 活性化に対する 1-DNJ の抑制メカニズムについて解析を進めている。
なお本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

NFκB, anti-inflammation, mulberry

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3B05a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B05 会場

食用菊抽出物のミクログリア細胞に対する抗炎症作用の栽培品種による比較

Anti-inflammatory effects of cultivar extracts derived from Chrysanthemum Morifolium Flowers, in microglia cells

○若生 豊、馬 東建（八戸工大工）
○Yutaka WAKOU, Dongjian MA (Hachinohe IT)

【目的】 菊花は漢方では薬として欠かせない配剤である。食用菊にも有益な生理作用が知られ健康に役立てられることが期待されている。生鮮食品に対しても食品機能表示が可能な制度が発足したが，生鮮食品では品種をはじめ種々の条件により効能が変化すること等があり，ほとんど普及していない。食用菊は国内でも約 60 種存在し，品種により健康機能が異なっていると考えられている。これまで，食用菊の神経細胞酸化傷害保護作用の栽培品種による比較を行い，種により大きく異なることを示した。本研究においては日本を代表する食用菊「阿房宮」と「延命楽」について神経細胞に対する炎症抑制作用を，マクロファージ様細胞 RAW264.7，およびミクログリア細胞 MG5 を用いて検討した。

【方法】 試料は同農場で栽培した，阿房宮および延命楽を用いた。乾燥花弁を粉砕し 5 倍量のヘキサン，80%メタノール，熱水で抽出を行い，各画分に分け。ヘキサン抽出物をトリメチルシリル化誘導体とし GCMS（EI 法）により検討した。免疫細胞を well plate に播種し培養後，被検試料を加えた培地と交換し 1h 前処理を施した。その後，LPS（10 ng/mL）を加え炎症反応を惹起し 24h 培養後，上清の NO，TNF-α を測定した。NO は Griess 法により測定した。TNF-α は TNFα 感受性の線維芽細胞株 L929 を用いたバイオアッセイ法により定量した。神経栄養因子 GDNF は培養上清を濃縮し SDS・ポリアクリルアミド電気泳動で分離し，PVDF メンブランに転写した後，特異抗体によりイムノブロットにより検出した。

【結果】両栽培品種のヘキサン抽出試料を GCMS 分析しトータルイオンクロマトグラムを比較した結果，主要なピークの保持時間が互いに異なっており，組成が異なることが示唆された。成分の同定は検討中である。各抽出画分について LPS 刺激の RAW264.7 の NO 産生抑制作用を検討した結果，ヘキサン抽出画分が最も強い抑制効果を示した。ヘキサン抽出画分に含まれるトリテルペノイドおよびその脂肪酸エステル類が強い抑制活性を示していることが示唆された。脳内の免疫調節で中心的な役割を担うグリア細胞に対する延命楽のヘキサン抽出物の作用を検討した結果，NO 産生および炎症性サイトカインである TNFα 産生を顕著に抑制した。これらの化合物は脳血管関門を通過し脳内へ到達することが知られており，グリア細胞の活性化を抑制し抗炎症作用を果たす可能性が示唆された。阿房宮の抽出物の NO，および TNFα 産生抑制効果は延命楽に比べ低かった。ミクログリアは本来 GDNF の分泌による脳組織の修復などを行っている。LPS 刺激によりミクログリアの GDNF 分泌は低下するが菊花抽出物は分泌を保護する作用を示した。

edible chrysanthemum flower, Antiinflammatory effects, Microglial cells

発表責任者：若生豊（wako@hi-tech.ac.jp）

講演番号：3B05a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B05 会場

ヒスタミン H1 受容体アンタゴニスト活性を有する食品化合物の探索

Screening of food compounds acting as the antagonist on histamine H1 receptors

○香山 凌子、平野 汐奈、太田 広人（熊本大院自然科学）
○Ryoko KOUYAMA, Yuna HIRANO, Hiroto OHTA (Kumamoto Univ. GSST)

【目的】細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体（GPCR）は 7 回膜貫通型の受容体であり、近年創薬のみならず、機能性食品成分の作用点としても注目されている。ヒスタミン H1 受容体（hH1R）は花粉症などのアレルギー疾患の誘発に関与する GPCR であり、ヒスタミンの刺激による受容体の発現亢進がアレルギー症状の悪化を引き起こす。本研究は、hH1R に対するヒスタミンのアゴニスト作用を抑制する物質、いわゆるアンタゴニストを食品化合物から探索し、その抗アレルギーメカニズムを明らかにすることを目的としている。
【方法】ヒト胎児腎細胞（HEK293 細胞）に hH1R 遺伝子発現ベクターpcDNA3-hH1R を安定導入し HEK/hH1R 細胞を得た。この細胞を用いて、hH1R アンタゴニスト活性を示す食品化合物の探索を行った。スクリーニング系には、ミトコンドリア移行型エクオリン（mtAEQ）による高感度 Ca アッセイを用いた(1)。アポ mtAEQ 発現ベクターpcDNA3-mtAEQ を HEK/hH1R 細胞に一過的に導入し、発光基質セレンテラジンを 4 時間作用させた。その細胞懸濁液に各食品化合物をヒスタミン存在下で作用させ、得られた発光量からアンタゴニスト活性を評価した。
【結果及び考察】スクリーニングの結果、大豆イソフラボンの一種ダイゼイン及びいくつかの類縁化合物にアンタゴニスト活性が見られた。10^{-5} M での活性を比較するとビオカニン＞ホルモノネチン＞ダイゼイン＝フィセチン＞ヘスペレチン＞ゲニステインの順であった。イクオール、EGCG、ケルセチン、ナリンゲニン、配糖体のダイジンやゲニスチンなどの評価も行ったが活性は見られなかった。以上の結果から、①イソフラボン骨格の 7 位と 4’位の水酸基は活性に重要である、②5 位の水酸基は活性に不利である、③4’位がメトキシ基だと②であっても高い活性が保持されるといったことが分かった。

（1）Ohta et al.: Functional characterization of dopamine and neuropeptide G protein-coupled receptors from the silkworm *Bombyx mori* by aequorin bioluminescence-based calcium assay. *ACS Book: "Advances in Agrochemicals: G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) and Ion Channels as Targets for Pest Control"* (2017).

GPCR, histamine receptor, food compounds

発表責任者：太田広人（hiohta@gpo.kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：3B05a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B05 会場

卵白及び卵黄の経皮感作能の比較とそれらの感作抗原の同定

Comparison of percutaneous sensitizing ability of egg white and egg yolk and identification of percutaneous sensitizing allergens

○小川 昂志、岡尾 亮祐、高蓋 秋穂、村上 浩規、岩本 和子、矢野 えりか、財満 信宏、森山 達哉(近大院農)
○Takashi Ogawa, Ryosuke Okao, Akiho Takafuta, Hiroki Murakami, Kazuko Iwamoto, Erika Yano, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama (Grad. school of agric. Kindai Univ.)

【目的】近年、食物アレルギーの一部は皮膚からの抗原侵入と感作が関与していることが明らかになりつつある。このように経皮的に抗原が侵入し、IgE 抗体が産生され、マスト細胞と結合した状態になる事を「経皮感作」という。鶏卵は食物アレルギーの主要な原因食物の 1 つで、小児期に最も多い食物アレルギー原因食品であり、卵黄よりも卵白の方が重度なアレルギー症状が出ることが知られている。そこで本研究では、マウスを用いた経皮感作モデルにて卵白、卵黄、全卵を皮膚に塗布し、卵白、卵黄のどちらがより経皮感作しやすいかという点を IgE-ELISA によって調べた。さらに、Western Blotting(WB)や 4 種の卵白アレルゲンコンポーネント(OVA、オボムコイド、オボトランスフェリン、リゾチーム)を用いた ELISA により卵白中の経皮感作抗原の同定を試みた。また、昨年報告した塗布する卵白タンパク質濃度を 4 種類に変えた実験においても同様に調べた。**【方法】**6 週齢の BALB/c マウスを用い、塗布する卵白サンプルの濃度を 0、1、5、20mg/mL の 4 種類に分けた実験①、タンパク質濃度 20mg/mL に調整した卵白､卵黄､全卵をそれぞれ塗布する実験②の計 2 つの経皮感作実験を行った。塗布サンプルは SDS（5%）を共存させた。4 種の卵白アレルゲンコンポーネント、卵白、卵黄、全卵と血清 IgE 抗体との反応性を ELISA や WB により調べた。また、実験①については卵白を、実験②については全卵を経口投与する惹起試験を行った。**【結果と考察】**実験①の血清 IgE と卵白との反応性を調べたところ、いずれの濃度の卵白タンパク質塗布群でも OVA、オボムコイド、オボトランスフェリンに対する IgE が有意に産生された。よって卵白塗布においては、これらの抗原が主な経皮感作抗原となりうることが示された。リゾチームに対する IgE はほとんど産生されなかった。実験②では、血清 IgE と卵白、卵黄、全卵との反応性を調べたところ、卵黄塗布群では卵白、全卵塗布群と比較して有意に反応性が低かった。WB によって全卵中のタンパク質と血清 IgE との反応性を調べたところ、卵白塗布群において複数の血清 IgE 結合バンドが検出されたが、卵黄塗布群においては主な IgE 結合バンドは 1 つしか検出されなかった。実験①、②の惹起試験の結果、両実験においてコントロール群以外の全てのサンプル塗布群において直腸温の有意な低下がみられた。以上の結果から、経皮感作においても卵黄よりも卵白の方が IgE 抗体産生能が高く、感作能が高いことが示唆された。また、卵白では複数のタンパク質が感作しうるが、卵黄では感作しうると考えられるタンパク質は少ないことが明らかになった。卵黄塗布群で感作しうると考えられた卵黄タンパク質を WB で検出したところ、分子サイズ約 70kDa 付近であった。現在この卵黄中の感作抗原の単離と同定を進めている。

percutaneous sensitization, food allergy, egg

講演番号：3B05a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B05 会場

甲殻類に寄生された魚類が有するアレルギーリスク
Allergy risk of the fish with parasitized crustaceans
○臼井 将勝[1]、出水 聡之[1]、杉浦 義正[1]、河邉 真也[1]、近藤 昌和[2]、宮﨑 泰幸[1] ([1]水産大学校・食品科学、[2]水産大学校・生物生産)
○Masakatsu USUI[1], Satoshi IZUMI[1], Yoshimasa SUGIURA[1], Shinya KAWABE[1], Masakazu KONDO[2], Taiko MIYASAKI[1] ([1]Fisheries Univ. food science, [2]Fisheries Univ. aquabiology)

【目的】甲殻類アレルギー主要アレルゲンのトロポミオシンは無脊椎動物において高い相同性を示し，広範囲に共通する汎アレルゲンとして報告されている。魚類に寄生するウオノエ科甲殻類もエビ類やカニ類と相同性の高いトロポミオシンを有していると考えられ，甲殻類アレルギー患者が摂食した場合はアレルギー発症リスクを伴うことが予想される。そこで本研究では，ウオノエに寄生されたキダイの調理品を摂食した場合の甲殻類アレルギーリスクについて検討した。

【方法】市販のキダイ（*Dentex tumifrons*）を購入し，頭部と中骨を用いて潮汁として調理した場合を想定して実験を行った。ウオノエ寄生状態で加熱調理したキダイ，ウオノエを除去したのちに加熱調理したキダイ，ウオノエ非寄生キダイの加熱調理品の 3 種各 10 個体から筋肉および煮汁を分取し実験試料とした。各試料を約 1 g 量りとり FA テストⅡ抽出用試薬「ニッスイ」を 19 倍容量となるよう加え，25℃で 15 時間振盪抽出したものを検体抽出液とした。検体抽出液中のエビトロポミオシン様タンパク質濃度は FA テスト EIA-甲殻類Ⅱ「ニッスイ」を用いて求め，同濃度をもとに調理品摂食時のアレルゲン総摂取量を算出しリスク評価を行った。加えて，検出されたエビトロポミオシン様タンパク質の分子量についてウエスタンブロット解析を行った。

【結果】各検体抽出液中のエビトロポミオシン様タンパク質濃度を測定した結果，ウオノエ寄生調理キダイの筋肉と煮汁，およびウオノエ虫体からの抽出液において，エビトロポミオシン様タンパク質の濃度が 1.000 ppm を上回った。各濃度は寄生調理キダイの筋肉で 2.202 ± 1.950 μg/g，同煮汁で 2.293 ± 1.096 μg/g，同ウオノエ虫体では 6669.680 ± 1783.422 μg/g であった。ウオノエ寄生キダイの潮汁一食（200 mL）を摂食した場合では，約 500 μg のエビトロポミオシン様タンパク質を摂取することが判明した。ウエスタンブロット解析から同タンパク質の分子量は約 35 kDa であり，一般的なエビトロポミオシンの分子量と同様であった。

parasitized crustacean, allergy risk, tropomyosin

発表責任者：臼井将勝（usuim@fish-u.ac.jp）

講演番号：3B05a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B05 会場

母乳中 CCL25 含有量と新生児のアトピー性皮膚炎発症との関連に関する研究

Study on the relationship between concentration of CCL25 in breast milk and development of atopic dermatitis in neonates

○阿部 紗織[1]、山出 史也[2]、中野 泰至[2]、下条 直樹[2]、茶山 和敏[1]([1]静岡大学創造科学技術大学院、[2]千葉大学大学院医学研究院小児病態学)
○Saori ABE[1], Fumiya YAMAIDE[2], Taiji NAKANO[2], Naoki SHIMOJO[2], Kazutoshi SAYAMA[1] ([1]Graduate School of Sci. & Tech., Shizuoka Univ., [2]Dept. of Ped., Graduate School of Med., Chiba Univ.)

【背景および目的】　我々は、ケモカインである、CCL25 の存在をマウスとヒトの母乳中で確認した。また、CCL25 を添加した人工乳を用いたマウスの人工哺育実験によって、母乳中の CCL25 は、新生仔の免疫器官やその機能の発達に関与していることを明らかにした。この結果から、母乳中の CCL25 はマウスだけでなくヒトの免疫発達にも影響を与える可能性が考えられた。そこで、我々は、ヒト母乳中の CCL25 含有量の経時的な変化について検討した。その結果、CCL25 は初乳と常乳のいずれの母乳にも存在し、常乳と比較して、初乳中で有意に高い濃度を示した。さらに、母親ごとの含有量では、初乳・常乳ともに非常に個人差が大きいことが明らかになった。このことから、母親による含有量の違いが、その母乳を飲む新生児の免疫発達に影響を与え、免疫発達の偏りが原因となって起こると考えられるアトピー性皮膚炎を含むアレルギー疾患の発症につながっている可能性が考えられた。しかし、母乳中の CCL25 含有量と新生児のアトピー性皮膚炎の発症との関連に関する報告はない。本研究では、ヒトの初乳と常乳中の CCL25 含有量について分析を行い、新生児のアトピー性皮膚炎の発症および母親のアレルギー疾患との関連について検討を行った。
【材料および方法】　千葉大学付属病院とその関連病院において正常分娩および帝王切開で生まれた新生児の母親を対象に、母乳（初乳 155 検体、常乳 166 検体）の採取を行い、ELISA 法を用いて乳清中のケモカインの定量を行った。そして、対象とした新生児の６ヶ月と１歳児および２歳児におけるアトピー性皮膚炎とさらに、母親のアレルギー疾患との関連について検討した。
【結果および考察】　常乳中の CCL25 含有量が平均値の 1.5 倍以上の濃度の母親から生まれた新生児では、６ヶ月と１歳児および２歳児におけるアトピー性皮膚炎の発症との強い相関が認められた。また、母親のアレルギー疾患との関連では、常乳中の CCL25 含有量が平均値の 1/2 以下の濃度の母親で、アトピー性皮膚炎や喘息、アレルギー性鼻炎をもつ割合が高かった。また、母親のアトピー性皮膚炎と新生児の発症との関連では、常乳中の CCL25 含有量が平均値の 1/2 以下の低濃度の母親で、アトピー性皮膚炎を持った母親からアトピー性皮膚炎を発症する新生児が育つ割合が最も高いという結果が示された。
　以上の結果から、母乳中 CCL25 の含有量が、その母乳で哺育された新生児のアレルギー疾患の発症と相関している可能性が示唆された。

Human breast milk, CCL25, Allergic diseases

発表責任者：茶山和敏（sayama.kazutoshi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B05a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B05 会場

ペクチンが食物アレルギーモデルマウスの抗体産生に及ぼす影響の解析

Effect of pectin on antibody production in murine model of food allergy

○山下 昇悟[1]、岩城 佳那[2]、矢部 富雄[1,2,3,4]、北口 公司[1,2,3] ([1]岐阜大院・自然科学、[2]岐阜大院・応生、[3]岐阜大・応生、[4]生命の鎖総合研究センター)
○Shogo YAMASHITA[1], Kana IWAKI[2], Tomio YABE[1,2,3,4], Koji KITAGUCHI[1,2,3] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. Natural Science and Technology, [2]Gifu Univ., Grad. Sch. Appl. Life Sci., [3]Gifu Univ., Dept. Appl. Life Sci., [4]G-CHAIN)

【目的】

食物繊維は、腸内細菌の産生する短鎖脂肪酸を介して生体調節作用を示すことが多数報告されている。一方で、食物繊維が直接生体に作用する可能性も示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。我々は、水溶性食物繊維の一種であるペクチンが、パイエル板の $CD11c^+$細胞の炎症性サイトカイン発現を調節することを見出だしている。パイエル板 $CD11c^+$細胞は抗原提示能も有し、腸管における T 細胞依存性抗体産生に重要な役割を担っている。そこで本研究では、ペクチンの給餌が腸管における抗体産生と食物アレルギー病態に及ぼす影響を調査し、ペクチンの新たなアレルギー調節経路を明らかにすることを目的とした。

【方法】

5～20%シトラスペクチン（CP）含有飼料を給餌した Balb/c マウスを卵白オボアルブミン（OVA）で免疫した後、OVA を複数回経口投与することでアレルギー性の下痢を誘導した。OVA 経口投与 10 日目のマウスから脾臓、腸間膜リンパ節（MLN）、小腸上部、ならびに血液を採取した。血清中の IgG_1、IgE 抗体濃度や OVA 特異的な抗体価を ELISA 法により測定した。各組織から mRNA を抽出し、RT-qPCR 法により、Th2 細胞のマスター転写因子 Gata-3、IgE と IgG_1 のクラススイッチに関与するサイトカイン IL-4、マスト細胞の分化マーカーMCP-1 の mRNA 発現量を測定した。

【結果】

OVA 一次免疫後の血中 IgG_1、IgE 濃度の上昇が CP 摂取により有意に低下したが、追加免疫後の IgG_1、IgE 濃度は対照群と同程度であった。しかしながら、OVA 特異的な IgG_1 と IgE 抗体価は CP 摂取群で有意に低下していた。一方、OVA 特異的な IgG_{2a} 抗体価は対照群と CP 摂取群で同程度であった。CP 摂取群の脾臓における Gata-3 と IL-4 の mRNA 発現量は対照群と同程度であったが、MLN における Gata-3 と IL-4 遺伝子発現量は有意に低下していた。さらに、CP 摂取群において OVA 経口投与後の下痢症状が対照群に比して緩和し、CP 摂取群の小腸上部における MCP-1 の mRNA 発現量も有意に低下していた。以上の結果より、CP は腸管において Th2 細胞の分化を抑制することによって IgG_1、IgE 抗体産生を調節し、食物アレルギーの予防効果を示す可能性が示唆された。

Pectin, Allergy, Antibody

講演番号：3B05a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B05 会場

不飽和脂肪酸乳酸菌代謝産物の免疫調節機能の解析

Immunoregulatory function of polyunsaturated fatty acid metabolites produced by gut lactic acid bacteria

○山本 愛日[1]、八代 拓也[1]、笠倉 和巳[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、西山 千春[1]([1]東理大基工、[2]京大院 農)
○Asuka YAMAMOTO[1], Takuya YASHIRO[1], Kazumi KASAKURA[1], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Kyoto Univ.)

近年、乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝経路が明らかとなると共に、二次代謝産物として炭素鎖の中央部が水酸化された水酸化脂肪酸や、さらなる脱水素・異性化反応を受けたオキソ脂肪酸・エノン脂肪酸が同定され、これら脂肪酸の生理活性が注目されている。一方、食餌成分や腸内細菌代謝物に含まれる短鎖脂肪酸や多価不飽和脂肪酸が免疫系細胞に作用する分子機構が示されてきているが、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、エノン脂肪酸が免疫系に及ぼす影響についてはほとんど明らかになっていない。本研究では、リノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸それぞれを初発物質として得られる水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、エノン脂肪酸の計 9 種類について、様々な免疫関連疾患の発症や病態につながる抗原提示細胞-T 細胞の相互作用過程に着目し、以下の通り細胞機能への作用を解析した。

OVA (Ovalbumin)特異的 T 細胞受容体のトランスジェニックマウス (OT-II マウス)から調製した脾臓細胞を OVA 添加条件下で培養し、培養上清中のサイトカイン IL-2 を測定することで T 細胞の活性化の程度を評価した。その結果、3 種類のエノン脂肪酸はいずれも IL-2 の産生を著しく抑制することが判明した一方、水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸を添加した際には IL-2 産生は対照群と同等か僅かに減少する程度であった。このことから、エノン脂肪酸には抗原提示に呼応した T 細胞活性化に対し強い抑制作用があることが示された。次に、抗原提示細胞非存在下で T 細胞に対する脂肪酸の影響を解析するため、脾臓由来 Naïve $CD4^+$T 細胞に CFSE を取り込ませ、抗 CD3/CD28 抗体を用いて刺激した際の細胞分裂をフローサイトメトリー法で解析した結果、エノン脂肪酸添加群はいずれも T 細胞分裂が低減していた。続いて、マウス骨髄細胞を顆粒球単球コロニー刺激因子 GM-CSF 存在下で培養して調製した BMDC (Bone marrow-derived dendritic cells)を TLR リガンドである LPS (Lipopolysaccharide)で刺激し、DC が発現する表面分子やサイトカインの mRNA レベルを定量的 PCR にて測定した。LPS は DC を活性化するため、MHC class II や CD86、IL-12、IL-6 の発現が著しく上昇するが、このような LPS 依存性発現上昇がエノン脂肪酸処理により有意に抑制された。

以上まとめると、リノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸を乳酸菌が代謝することによって生じるエノン脂肪酸には抗炎症や免疫抑制作用があることが明らかとなり、その作用機序として、エノン脂肪酸が T 細胞に直接作用して細胞増殖を抑制することに加え、DC の抗原提示関連分子やサイトカインの発現を抑えることにより T 細胞の分化増殖を抑制する多面的な効果が示唆された。

polyunsaturated fatty acid, lactic acid bacteria, immnosuppressive function

講演番号：3B05a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B05 会場

Kaempferol による RALDH2 発現誘導メカニズム

Mechanism of kaempferol-induced up-regulation of RALDH2 expression

○綿貫 優実、八代 拓也、山口 昌樹、笠倉 和巳、西山 千春（東理大基工）
○Yumi WATANUKI, Takuya YASHIRO, Masaki YAMAGUCHI, Kazumi KASAKURA, Tiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci.)

レチノイン酸合成酵素の一種であるRetinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)は、腸管に局在する樹状細胞 (DC; dendritic cells)に特徴的に発現しており、食餌由来のビタミンAをレチノイン酸に変換する。レチノイン酸は、抗原特異的な免疫寛容の成立に重要な制御性T細胞の分化を促すことから、腸管DCに発現するRALDH2は、T細胞の機能調節を介して腸管の免疫恒常性維持に貢献することが知られている。我々は、日々の食生活がアレルギーや炎症性疾患に影響を及ぼす分子機構の解明と、予防や病態改善に繋がる食事条件の提案を最終目的に、RALDH2の発現を亢進する食品成分の探索を行っている。これまでに、フラボノール類の一種であるKaempferolが有意にRALDH2の発現及び酵素活性を上昇させることを見出しているが、その機序が不明であったことから、本研究では、KaempferolがDCのRALDH2発現を誘導するメカニズムの解析を行った。

フラボノール類は核内受容体を標的とする報告例が多く、Kaempferol についても Aryl hydrocarbon receptor (AhR)や Liver X receptor (LXR)のリガンドとして機能する報告があったことから、DC における RALDH2 発現上昇にこれらの受容体が関与するかについて検討することにした。マウス骨髄細胞を Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 存在下で培養することで Bone marrow-derived DC (BMDC)を誘導した。AhR あるいは LXR に対する siRNA を BMDC に導入した後、RALDH2 mRNA 量を qPCR にて解析した。その結果、AhR ノックダウンにより DC の RALDH2 mRNA 量は上昇し、さらに AhR ノックダウンは Kaempferol による RALDH2 発現亢進作用を消失させた。これより、AhR は RALDH2 遺伝子発現の負の転写調節因子であり、Kaempferol は AhR の機能抑制を介して RALDH2 発現を亢進することが示唆された。一方、LXR をノックダウンしても RALDH2 mRNA 量は変化せず、Kaempferol による RALDH2 の発現亢進も確認されたことから、LXR は RALDH2 の遺伝子発現調節には関与しないと判断された。BMDC を AhR のアゴニストである Tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD)、あるいはアンタゴニストである CH223191 で処理し、RALDH2 の発現及び酵素活性を測定した結果、TCDD の処理により発現量、酵素活性共に減少し、CH223191 では Kaempferol と同様に増加することが示された。この結果は、AhR が RALDH2 遺伝子発現の負の転写調節因子であることを支持するものと考えられる。

以上まとめると、DC の RALDH2 遺伝子発現において AhR は負の転写調節因子であり、Kaempferol は AhR の機能阻害によって RALDH2 の発現上昇させることが示唆された。

raldh2, ahr, kaempferol

講演番号：3B05a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B05 会場

レスベラトロール類縁化合物の免疫抑制作用

Immunosuppressive function of resveratrol and its derivatives

○八代 拓也、由良 志織、笠倉 和巳、西山 千春（東理大基工）
○Takuya YASHIRO, Shiori YURA, Kazumi KASAKURA, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci.)

RSV (Resveratrol)はブドウ果皮に含まれるポリフェノールであり、アレルギー性疾患や自己免疫疾患のモデルマウスにおいて病態の発症や進行を妨げることが報告されている。本研究では RSV とその類縁化合物の免疫抑制作用を比較し、機能発現メカニズムを解明することにした。

OVA (Ovalbumin)反応性 T 細胞受容体トランスジェニックマウスである OT-II 由来の naïve $CD4^+$T 細胞と OVA を取り込ませた BMDC (Bone marrow-derived dendritic cells)を共培養すると、抗原提示を受けた T 細胞は活性化し増殖する。この反応系に RSV とその類縁化合物を添加したところ、RSV の 2 つの水酸基がメトキシ基に置換された PSB (Pterostilbene)によって T 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。$CD4^+$T 細胞は、免疫反応の促進に寄与する Th1、Th2、Th17、あるいは抑制に寄与する Treg (Regulatory T cell)へと分化することが知られているが、同様の共培養をこれらの細胞への分化誘導条件下で行い、PSB の影響を解析したところ、Th1 への誘導が抑制される一方で、Treg への誘導が亢進された。$CD4^+$T 細胞のみを抗 CD3/CD28 抗体を用いて刺激した場合の PSB の影響を解析したところ、細胞増殖が抑制されることが示され、分化誘導条件下で行った場合には、Th1 への誘導が抑制される一方で、Treg への誘導には変化がなかった。以上の結果から、PSB は直接 T 細胞に作用して細胞増殖や Th1 への分化を抑制することに加え、間接的な機構を介して Treg への分化を亢進することが示された。そこで BMDC に対する PSB の影響を解析したところ、PSB 処理により MHC class II や CIITA、CD86、CCR7 の遺伝子発現が低下し、LPS 刺激による IL-6 及び IL-12、TNF-α の産生亢進も抑制されることが示された。我々は *Ciita* や *Cd86*、*Ccr7*、*Tnf-α* の遺伝子発現を制御する転写調節因子として PU.1 を見出していることから、PSB 処理が PU.1 へ及ぼす影響を検証した。その結果、BMDC を PSB 処理しても PU.1 の発現量に影響しなかったが、クロマチン免疫沈降法を行ったところ、上記の遺伝子全てにおいてプロモーターへの PU.1 の結合が低下することが明らかとなった。siRNA を用いて PU.1 をノックダウンした BMDC と OT-II 由来の naïve $CD4^+$T 細胞を共培養したところ、Treg の誘導が促進されたことから、PSB による Treg 誘導の亢進は、DC における PU.1 のプロモーター領域への結合阻害を介した PU.1 標的遺伝子の発現低下によることが示唆された。

以上まとめると、PSB は RSV よりも強力な免疫抑制作用を発揮することが期待され、その作用機構としては、T 細胞に直接作用して細胞増殖や Th1 への分化を抑制することに加え、DC に作用して間接的に T 細胞の Treg への分化を亢進することが明らかとなった。

pterostilbene, immunosuppressive function

講演番号：3B05a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B05 会場

野生型およびミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のサイトカイン産生に及ぼすビタミン C の影響

Effect of vitamin C on the production of cytokines from wild-type and myeloperoxydase-deficient neutrophils

○髙取 沙織、荒谷 康昭（横浜市大生命ナノ）
○Saori TAKATORI, Yasuaki ARATANI (Yokohama City Univ.)

【目的】

自然免疫系の一員である好中球は食細胞 NADPH オキシダーゼによって酸素からスーパーオキシド(O_2^-)を、自発的あるいはスーパーオキシドディスムターゼによって O_2^-から過酸化水素(H_2O_2)を、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)によって H_2O_2 から次亜塩素酸(HOCl)などの活性酸素を活発に産生することで殺菌を営んでいる。我々は MPO 欠損(MPO-KO)好中球を酵母の細胞壁成分であるザイモザンで活性化させた場合、MIP-2 を初めとする種々の炎症性サイトカインを野生型好中球よりも過剰に産生することを既に報告している。この結果は、好中球が産生する活性酸素の量が減少すると好中球から産生されるサイトカインの量が増大する可能性が高いことを示している。本研究ではこの可能性を明らかにすることを目的とし、抗酸化物質としてのビタミン C(VitC)が野生型および MPO-KO 好中球からのサイトカイン産生に及ぼす影響を比較解析した。

【方法と結果】

野生型マウスの大腿骨骨髄から単離した好中球にザイモザンと VitC を添加し、3 時間培養後の培養上清中に分泌された MIP-2 量を ELISA 法で測定した。その結果、ザイモザンのみを添加した場合と比較して産生量がおよそ 4 倍増大した。また培養後の野生型好中球から調製した RNA をリアルタイム RT-PCR に供して MIP-2 の遺伝子発現量を測定したところ、VitC の添加によってその発現量は顕著に増加した。これらの結果から、VitC はザイモザンで刺激された野生型好中球からの MIP-2 の発現を促進することが明らかとなった。このような VitC の効果は MIP-2 に限らず、他の主要な炎症性サイトカイン(TNF-α、MIP-1α、MIP-1β)においても確認された。一方で興味深いことに、ザイモザンで刺激された MPO-KO 好中球では VitC の効果は認められず、VitC 非添加時の各種サイトカインの産生量と比較して有意な増加は認められなかった。以上の結果から、野生型好中球が産生する HOCl が VitC によって消去されることでサイトカインの産生量が上昇することが強く示唆された。

vitamin C, reactive oxygen species, neutrophil

講演番号：3B05a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B05 会場

タモギタケ中βグルカンは M1/M2 マクロファージ分化を調節する
The glucan from *Pleurotus citrinopileatus* regulates a differentiation to M1/M2 macrophage through multiple pathway
○湊 健一郎[1]、小原 章裕[1,2] ([1]名城大農、[2]名城大院)
○Kenichiro MINATO[1], Akihiro OHARA[1,2] ([1]Meijo Univ., [2]Graduate School of Meijo Univ.)

マクロファージには，炎症性サイトカインTNF，IL-6やIL-12を産生して炎症を惹起することにより，免疫系を賦活化する1型マクロファージ（M1Mφ）や，IL-4やIL-10などのTh2型サイトカインによって分化が誘導される炎症抑制型マクロファージ（M2Mφ）など，いくつかのサブタイプが存在する。これらサブタイプすなわち，M1 Mφには炎症促進作用があるため，感染防除や腫瘍の排除が期待でき，一方M2Mφは，異物・老廃組織の除去や免疫制御をおこなうことが知られている。しかしながら特定のMφだけが過度に増殖すると，免疫性疾患を誘発してしまう。そのためこれら機能的に異なるマクロファージのバランスを調節することが重要であり，それが免疫性疾患に対する新たな治療法となると期待されている。たとえば炎症性免疫応答が病態の増悪に関与する動脈硬化症では，M1MφからM2Mφへの形質変換が、また逆にアレルギー性疾患である気管支喘息などでは，M2からM1への形質変換を誘導することが，それらの予防・治療には有効であると考えられる。本実験では食用きのこタモギタケ中の機能性β1,6-グルカンの，M1/M2 Mφ分化の各段階における作用を調べた。
[方法および結果]
本βグルカンは成熟したヒトマクロファージ(mMφ)に対しては，炎症性サイトカインの分泌を促す。そこで，未分化単球および未熟マクロファージ（M0Mφ）に対する作用を調べた。本実験では分化の指標として，各マクロファージが分泌するサイトカインおよびケモカインについて，タンパク質レベルおよび mRNA 発現レベルをそれぞれ，ELISA および qPCR により測定した。それらの結果，未分化単球に対して本 β グルカンを処理すると，分化後成熟 mMφ からの TNF および L-6 の生成・分泌が有意に抑制された。一方で IL-10 産生については，成熟マクロファージに対する作用と同様に，本 β グルカン処理により，その分泌が促進された。さらにケモカインについては，M1Mφ で発現が促進される CXCL9 および CCR2 の mRNA が，本グルカンによる単球刺激により mMφ ではそれらの発現が有意に抑制された。一方 M2Mφ でその発現が促進される CCL2 および CCL8 は，本グルカン刺激により発現の上昇がみられた。これらのことより，未分化状態で本 β1,6-グルカンの刺激を受けた場合，M2 タイプの分化へと誘導されることが示唆された。次に，本グルカンは未熟 Mφ (M0 Mφ) に対してどのように作用するか調べた結果，成熟 Mφ からは TNF および IL-6 の生成・分泌が有意に上昇した。そこで，この差異の原因を探るため，各中和抗体を用いて細胞表面上のパターン認識レセプターの本グルカンに対する認識性を調べた。その結果，本 β1,6-グルカンは細胞上の Dectin-1 に認識されると炎症促進性（M1 分化）の挙動を示すことが示唆された。現在，M2 分化を制御するレセプター認識の有無について調査している。

β-glucan, macrophage, immunomodulating effect

発表責任者：湊健一郎（minato@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3B05p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B05 会場

ポリフェノールオキシダーゼによる茶カテキンの自然抗体リガンド生成能の増強

Formation of ligand for natural antibody by polyphenol oxidase-oxidized tea catechin

○今堀 夏奈美[1]、三輪 恭行[1,2]、李 相美[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[3]（[1]名大院・生命農、[2]佐藤食品工業（株）、[3]東大院・農学生命）
○Kanami Imahori[1], Yasuyuki Miwa[1,2], Sangmi Lee[1], Takahiro Shibata[1], Koji Uchida[3] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ, [2]Sato Foods Industries Co., Ltd, [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

自然抗体が関与する自然免疫系の適度な活性化は疾病予防に寄与するものと考えられる。当研究室ではこれまでに、血清アルブミンが茶に含まれるポリフェノールの 1 種である Epigallocatechin gallate（EGCG）と反応することにより、自然抗体に認識されるようになることを明らかにしてきた。また、様々な茶抽出物と反応させた血清アルブミンに対する自然抗体の交差性を検討したところ、紅茶などの発酵茶において高い交差性が確認された。このことから、茶葉に含まれる酸化酵素である polyphenol oxidase(PPO)によるカテキン類の酸化が重要であることが示唆された。そこで本研究では、PPO と反応させた茶カテキンに着目し、その自然抗体リガンド付与活性を評価すると共に、抗原認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

PPO 処理した主要な茶カテキン類と反応させたヒト血清アルブミン（HSA）に対する自然抗体の交差性を ELISA 法により検討した。その結果、HSA に抗体リガンド活性を与えなかった Epicatechin gallae（ECG）は、PPO と反応することで HSA に抗体リガンド活性を付与するようになることが明らかになった。PPO 処理した ECG と反応させたヒト血清アルブミン（oxECG-HSA）と自然抗体との交差性について更に検討を行ったところ、PPO 処理濃度依存的かつ、処理時間依存的にその交差性は上昇した。NaCl により PPO の活性阻害を行ったところ、NaCl 濃度依存的に IgM 抗体との交差性は減少した。さらに、oxECG-HSA は、表面電荷の陰性化や、タンパク質カルボニル形成が促進されることが明らかになった。このことから、HSA のリジン残基のカルボニル化に伴う表面電荷の陰性化により、IgM 抗体に対する認識能が増加することが示唆された。現在、HSA に抗体リガンド活性を付与する酸化 ECG について解析を進めている。

catechin, polyphenol oxidase, IgM

講演番号：3B05p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B05 会場

自然抗体エピトープを有する食品成分の探索
Identification of food components as natural antibody epitopes

○三輪 恭行[1,2]、今堀 夏奈美[2]、古橋 麻衣[2]、柴田 貴広[2]、内田 浩二[3]（[1]佐藤食品工業(株)、[2]名大院・生命農、[3]東大院・農学生命）
○Yasuyuki Miwa[1,2], Kanami Imahori[2], Mai Furuhashi[2], Takahiro Shibata[2], Koji Uchida[3] ([1]Sato Foods Industries Co., Ltd., [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Unive, [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

免疫とは、生体内に入り込んだ非自己の細胞や分子等を認識して排除する機構である。免疫には、自然免疫と獲得免疫の 2 種類があり、自然免疫は初期防御機構を担い、迅速に抗原を認識し、獲得免疫を誘導させることで、より抗原特異的な排除機構が働く。自然免疫に関わる抗体として自然抗体があり、自然抗体は外来抗原の感染や意図的な免疫がない状態でも生体内で産生される抗体であり、アイソタイプは主に IgM 型である。自然抗体は内因性・外因性抗原の共通の特徴を幅広く認識することにより異物の排除や生体の恒常性維持に寄与していると考えられている。また、特定の食品の摂取により、感染症の防御やアレルギー予防などの機能性が報告されている。本研究では、食品成分と自然抗体との相互作用に着目し、自然抗体と交差性を示す食品成分の探索と、食品摂取による免疫系への作用解明を目的とする。

【方法・結果】

野菜等の植物性食品の熱水抽出物について、マウス血清中 IgM 自然抗体の交差性を ELISA 法により検討した。その結果、IgM 自然抗体があずき熱水抽出物に強い交差性を示すことを見出した。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーによりあずき熱水抽出物を分画し、各画分について ELISA 法により評価したところ、IgM 自然抗体の高い交差性を示す画分が認められた。さらに、フェノール硫酸法により、その画分に高分子多糖類が含まれていることが明らかとなった。現在、IgM 自然抗体の交差性を示す多糖類について、その構成糖組成比の解析を進めている。

natural antibody, IgM, azuki

講演番号：3B05p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B05 会場

IFN-γ産生増強を促す野沢菜由来活性成分の探索

Screening of active compounds from *Brassica rapa* L. inducing IFN-γ production

○山本 佳奈、古屋 花暖、山田 和輝、髙橋 楓香、濵島 知里、田中 沙智（信州大院・総合理工・農）
○ Kana YAMAMOTO, Kanon FURUYA, Kazuki YAMADA, Fuka TAKAHASHI, Chisato HAMAJIMA, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)

【背景・目的】食品由来の成分が免疫機能を制御することが知られており、食を介して免疫バランスを適切に改善することが、免疫関連疾患の発症予防において有用な方法の一つである。我々はこれまでに、信州の伝統野菜である野沢菜（*Brassica rapa* L.）の熱水抽出不溶性画分をマウス脾臓細胞に添加した際に、活性化した樹状細胞から産生される IL-12 を介して、NK1.1 陽性細胞から IFN-γが産生誘導されることを明らかにしている。また、野沢菜の活性成分は Toll-like receptor（TLR）2 や TLR4 に認識されるリガンドであることが示されているが、多糖類の関与については証明できていない。そこで本研究では、野沢菜による IFN-γ産生誘導に関与する多糖のレセプターやその下流のシグナル伝達経路を明らかにするとともに、免疫賦活効果を示す活性成分の探索を試みた。

【方法】C57BL/6 マウスより脾臓細胞を単離し、C 型レクチンレセプター（CLR）が多糖を認識する際に必要なカルシウムのキレート剤である EDTA で脾臓細胞を処理し、野沢菜不溶性画分を添加した後 48 時間培養したときの IFN-γ産生量を ELISA で測定した。また、NF-κB の阻害剤である Bay11-7082、および Syk の阻害剤である R406 と Piceatannol で脾臓細胞を処理した時の野沢菜不溶性画分による IFN-γ産生量についても同様に検討した。次に、野沢菜不溶性画分を 90℃で 30 分間、酸やアルカリで処理した後、脾臓細胞に添加した時の IFN-γ産生量を測定した。また、フェノール硫酸法にて野沢菜不溶性画分に含まれる中性糖を検出し、カルバゾール硫酸法にて酸性糖量を測定した。さらに、トリフルオロ酢酸で処理した野沢菜不溶性画分の単糖組成については、HPLC を用いて解析した。

【結果・考察】脾臓細胞を EDTA や NF-κB および Syk の阻害剤で処理したところ、野沢菜不溶性画分による IFN-γ産生誘導は有意に低下した。また、酸やアルカリで処理した野沢菜不溶性画分は、無処理に比べて脾臓細胞からの IFN-γ産生を有意に低下させることが示された。さらに、野沢菜不溶性画分で中性糖および酸性糖が検出され、グルコースやガラクトースなどが比較的多く含まれることが示された。以上のことから、野沢菜の活性成分は樹状細胞などに発現する CLR に認識され、NF-κB や Syk などのシグナルを介してサイトカイン産生を誘導することが示された。また、野沢菜の活性成分としてグルコースやガラクトースなどの中性糖や酸性糖で構成される多糖類が関与することが示唆された。今後は、化学的な分析方法と酵素処理を組み合わせることにより、免疫賦活作用に重要な野沢菜由来の多糖の構造を同定したいと考えている。

Brassica rapa L., IFN-γ, Polysaccharide

講演番号：3B05p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B05 会場

発酵青バナナ末(バナファイン®)経口摂取による免疫賦活効果の検討

Investigation of immune-stimulating effects by oral intake of fermented unripe banana powder

○金 有宏[1]、昆 良子[1]、石田 有希子[1]、堀江 健二[1]、坂下 真耶[1]、渡辺 陽介[2]、扇谷 えり子[3]、松田 修[3]、金 武祚[1] ([1](株)ファーマフーズ、[2](株)ドール、[3]京都府立医科大学)
○Yugweng Kim[1], Ryoko Kon[1], Akiko Ishida[1], Kenji Horie[1], Maya Sakashita[1], Yosuke Watanabe[2], Eriko Ohgitani[3], Osam Mazda[3], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Dole Japan, Inc., [3]Department of immunology Kyoto Prefectural University of Medicine)

【背景・目的】

バナナ（CAVENDISH 種）は日本で最も多く消費されている果物であり、フィリピン等の亜熱帯地域で 1 年を通じて栽培される。収穫された未成熟の青バナナはそのまま消費国へ輸出され、国内で熟成し出荷されるが、生産現地ではその一部が未利用のまま廃棄されてきた。我々はこれまで未利用青バナナの高度利用を目的として、青バナナの果実部から調製した粉末を酵素・発酵処理し、免疫賦活能を有する発酵青バナナ末(バナファイン®)の開発を行ってきた。これまで培養細胞を用いた研究で発酵青バナナ末がサイトカイン産生能を上昇させることを確認した。更にマウスを用いたインフルエンザウイルスの感染試験では、生存率改善効果も確認した。本研究では、発酵青バナナ末を経口摂取した際のマウス及びヒトでの免疫賦活効果、特にリンパ球に及ぼす効果を中心とした検討を行った。

【方法】

マウス試験：マウス(BALB/c マウス、8 週齢、雌)を用い、Control 群は蒸留水を経口投与し、発酵青バナナ末は水溶液に溶かして 0.1 mg/g B.W.(Low dose 群)、0.5 mg/g B.W.(High dose 群)を各群に経口投与した(各群 5 匹)。10 日間経口投与した後、脾細胞を回収後プレートに播種し、LPS、ConA で刺激を与えて 24 時間、72 時間培養後、培養上清中のサイトカイン量を ELISA により測定した。

ヒト試験：健常な男女 28 名(平均年齢 37±12 歳)を対象に単盲検法で試験食(発酵青バナナ末)または対照食(デキストリン)(各 500 mg/day)の摂取試験を行った。検体摂取 4 週間後に採血を行い、PBMC(末梢血単核細胞)を分離し、更にリンパ球を分取した。分取したリンパ球に LPS で刺激を与えて 24 時間培養後、培養上清中のサイトカイン量を ELISA により測定した。

【結果】

マウス試験：培養上清中の TNF-α を測定した結果、発酵青バナナ末 High dose 群で Control 群と比較して有意($p<0.001$)な発現量増加が認められた。ConA 及び LPS 刺激 72 時間培養上清中の TNF-α を測定した結果、High dose 群($p<0.001$)、Low dose 群($p<0.05$)で投与量に依存した有意な発現量増加が認められた。

ヒト試験：摂取前と摂取 4 週間後の TNF-α 量を比較した結果、LPS 刺激を与えると、発酵青バナナ末を摂取した群では 4 週間後においてリンパ球の TNF-α 産生量が有意($P<0.001$)に上昇した。マウス及びヒトにおいて発酵青バナナ末の経口摂取により免疫細胞であるリンパ球の反応性(サイトカイン産生量）が上昇したことから、発酵青バナナ末(バナファイン®)は免疫力を高める食品素材であることが示唆された。

banana, immunity

発表責任者：金 有宏（y-kim@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3B05p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B05 会場

食品コウジカビの T 細胞応答調節効果：自己免疫疾患モデルマウスを用いた解析

Regulatory effects of koji fungi on T cell responses of NOD mice

○北爪 里欧[1]、河野 菜摘[1]、利根川 直也[1]、若井 寿樹[1]、宇田 佳功[1]、関口 昭博[2]、榎本 淳[1]（[1]群大院理工、[2]群馬産技セ）
○Rio KITAZUME[1], Natsumi KONO[1], Naoya TONEGAWA[1], Toshiki WAKAI[1], Yoshinaru UDA[1], Akihiro SEKIGUCHI[2], Atsushi ENOMOTO[1] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma Industrial Technology Center)

【目的】演者らはこれまでに群馬産業技術センターの関口らにより開発された粉体麹（特許 3858068 号）の BALB/c マウス免疫系に及ぼす作用について調べ、粉体麹が T 細胞の増殖応答には影響を与えないものの、一般に Th1 応答を高め、逆に Th2 応答を弱める効果がある可能性を見出し、そのような効果が粉体原料やコウジカビの代謝産物ではなく、コウジカビ菌体そのものに起因することを明らかにしてきた。さらにコウジカビの Th2 応答減弱効果が、Th2 応答が優勢な鶏卵アレルギーモデルである OVA-IgE マウスでも観察されることも示した。本研究では、このような食品コウジカビの Th1 応答増強効果に着目し、OVA-IgE マウスとは逆に Th1 や Th17 応答が優勢な自己免疫疾患（１型糖尿病）モデルである NOD マウスを用いて、それを詳細に検討することにした。
【結果および考察】あらかじめ加熱殺菌処理を施した黄、白、醤油コウジカビ（樋口松之助商店製）を用いた。１型糖尿病未発症の NOD マウス（♀、11～12 週齢）の脾臓細胞をこれら 3 種類のコウジカビを添加して培養したところ、抗 CD3 抗体刺激により誘導される T 細胞増殖応答がコウジカビの種類や添加濃度（0.1～100 μg/ml）に関わらず、ほとんど変化しないことが明らかとなった。次に、上記脾臓細胞に抗 CD3 抗体刺激を与えて培養し、培養上清中の IL-4、6、10、12、IFN-γ産生量を ELISA にて測定したところ、IL-6、10、IFN-γ産生応答が有意に誘導された。ここにコウジカビを添加した場合、3 種類全てにわたり、IL-10 応答に対してはほとんど影響を与えなかったものの、IL-6 および IFN-γ応答、特に後者に対してコウジカビが増強効果を有することが示された。

IFN-γ応答に関しては、抗 CD3 抗体のような活性化刺激を与えない無添加群においても、コウジカビの添加によりその産生が強く誘導されることが明らかとなった。興味深いことに、このようなコウジカビの IFN-γ応答増強効果には最適濃度が存在し、1 および 100 μg/ml ではほとんど認められないものの、10～40 μg/ml の極めて狭い濃度範囲で添加した場合のみ、強力な IFN-γ応答が観察された。その理由を解明することは今後の課題となるが、Th1 応答が優勢な NOD マウスを用いることにより初めて見出された知見である。なお、このようなコウジカビの Th1 応答増強効果は、特に黄コウジカビで顕著であり、醤油コウジカビ、白コウジカビの順で弱くなることも明らかとなった。

これらの結果をまとめると、食品コウジカビ、特に黄コウジカビは *in vitro* において一般にマウス T 細胞増殖応答には影響を与えないものの、Th1 応答を高める可能性があると考えられる。今後は NOD マウスに黄コウジカビを経口投与した場合の Th1 応答増強効果についても検討していきたい。

Koji fungi, T cell response, Cytokine

発表責任者：榎本 淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3B05p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B05 会場

白金ナノコロイドはパラジウムアレルギーを抑制する
Platinum nanoparticles inhibit palladium allergy
○澁谷 修一[1,2]、立花 知子[1]、横手 幸太郎[1]、清水 孝彦[1]（[1]千葉大院医、[2]日本学術振興会特別研究員 DC1）
○Shuichi Shibuya[1,2], Tomoko Tachibana[1], Koutaro Yokote[1], Takahiko Shimizu[1]（[1]Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., [2]J S P S Research Fellow DC1）

パラジウムは宝飾品や歯科金属に含まれる身近に存在する金属であるが、金属アレルギーを引き起こしやすい金属としてパラジウム使用のリスクが指摘されている。以前我々は、パラジウム(nPd)および白金(nPt)ナノコロイド含有合剤が SOD およびカタラーゼ活性を有し、老化モデルマウスにおいて外用塗布が酸化ストレスに起因する皮膚萎縮を改善すると報告した[1)]。しかしながら、nPd/nPt 合剤のパラジウムアレルギーに対する安全性については不明な点が多い。本研究では、nPd/nPt 合剤のパラジウムアレルギー誘導能を評価することを目的とした。

アレルギー誘導能を比較するために、nPd/nPt 合剤、 nPd 単剤、nPt 単剤、陽性対照として $PdCl_2$ を試験に使用した。 まず、これら金属ナノコロイドおよび金属イオンを野生型マウスの足裏に LPS と同時に週 1 回/計 4 回皮下投与し金属に対する獲得免疫を誘導した。獲得免疫誘導後、再度同じ金属ナノコロイドまたは金属イオンを耳に皮下投与し金属アレルギー誘導能を調べた。その結果、nPd 単剤を投与した耳の厚さは $PdCl_2$ と同様に炎症誘導されたが中程度であった。一方、nPd と nPt を含む合剤を投与した耳では、全く炎症が誘導されなかった。耳組織での炎症関連遺伝子発現を調べたところ、パラジウムで応答した *Inf-γ*、*Il-1β*、*Tnfα*遺伝子発現が nPd/nPt 合剤投与で有意に抑制された。ヒトのパッチ試験において nPd 単剤および nPd/nPt 合剤に皮膚の炎症反応は認められなかった。

以上の結果から、nPt は nPd の金属アレルギー誘導能を抑制する作用が示唆された。強いカタラーゼ活性を有する nPd/nPt 合剤塗布による白斑改善効果も報告されており[2)]、パラジウムアレルギー誘導能が認められない nPd/nPt 合剤（パプラール®）は安全な外用物質として様々な皮膚治療への応用が期待できる。

1. Shibuya *et al. PLoS One* 2014, 9, e109288
2. Tsuji et al. *J. Invest. Dermatol.* 2017, 137, 1582-86

skin, metal allergy, nanoparticle

講演番号：3B05p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B05 会場

生理的濃度のルテオリンは Nrf2-Keap1 経路を薬物代謝第 II 相酵素の発現量を調節する

Physiological concentration of luteolin induced phase II drug-metabolizing enzymes by modulating Nrf2-Keap1 pathway

○北風 智也[1]、牧山 敦志[2]、山下 陽子[2]、芦田 均[2] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]神戸大院・農)
○Tomoya KITAKAZE[1], Atsushi MAKIYAMA[2], Yoko YAMASHITA[2], Hitoshi Ashida[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ.)

【背景】ルテオリン（2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromenone）はシソやピーマンなど多くの植物に含まれるフラボノイドであり、日常的に摂取する食事で血中濃度が 100 nM 程度に達する。これまでにルテオリンは肝臓における薬物代謝第 I 相酵素の発現誘導を抑制すること、薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現量を増加させることが報告されている。しかし、これらの作用は 100 nM を超える濃度での作用であり、日常的な食事で達する生理的な濃度である 100 nM 以下のルテオリンが生体に及ぼす影響は不明である。
【目的】Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)は、薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現を介して酸化ストレスなどに対する防御機構を担う転写因子である。Nrf2 は Keap1 と複合体を形成しており、活性が制御されている。そこで本研究では、生理的濃度のルテオリンが肝臓の薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現と Nrf2 の活性化に与える影響を検討することで作用機序を解明することを目的とした。
【方法・結果】ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞を 10 pM から 1 μM のルテオリン存在下で培養し、薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現量をウェスタンブロット法で解析した。その結果、全ての濃度のルテオリンで薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現量が増加した。Nrf2 の活性化を評価するため、Nr2 のリン酸化と核内移行をウェスタンブロット法で解析した結果、ルテオリンは Nrf2 のリン酸化と核内移行を促進した。また、Nrf2 が抗酸化剤応答配列への結合を EMSA を用いて解析した結果、ルテオリンによって結合量が増加することが明らかとなった。ルテオリンは Nrf2 の mRNA 発現には影響を与えなかった。Keap1 と複合体を形成している Nrf2 はユビキチン化されることでプロテアソーム系を介して速やかに分解される。ルテオリンが Nrf2 の分解に与える影響をタンパク質の翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で検討した結果、ルテオリンは Nrf2 の分解を遅延することが明らかとなった。そこで次に、プロテソーム阻害剤である MG132 存在下でルテオリンが Nrf2 のユビキチン化に与える影響を、免疫沈降法を用いて解析した。その結果、ルテオリンは Nrf2 のユビキチン化を抑制した。Keap1 の構造変化によって、Keap1-Nrf2 の複合体が解離することから、Keap1 の構造変化を評価した結果、ルテオリンは構造変化した Keap1 を増加させた。以上の結果から、生理的濃度のルテオリンは Nrf2-Keap1 複合体に作用し、Keap1 の構造を変化させることで、Keap1 を Nrf2 から解離させることで Nrf2 を分解から保護することで活性化し、下流の薬物代謝第Ⅱ相酵素の発現量を増加させることが示唆された。
本研究は科学研究費補助金 17H00818 の助成を受けたものです。

Nrf2, Keap1, phase II drug-metabolizing enzymes

講演番号：3B05p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B05 会場

SIRT6 活性化食品成分による DNA 損傷の修復

Repair of DNA damage by SIRT6 activating food ingredient

○川野 元一[1]、松岡 沙季[1]、片倉 喜範[1,2] ([1]九大院・生資環、[2]九大院・農院)
○ Gen-ichi KAWANO[1], Saki MATSUOKA[1], Yoshinori KATAKURA[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu Univ., [2]Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

[目的]
近年、長寿遺伝子サーチュインを中心とした抗老化研究に注目が集まっている。ヒトには SIRT1～SIRT7 のサーチュインファミリーが存在しており、SIRT6 を強制発現したマウスにおいて寿命が延長するという報告がなされた。更に、SIRT6 は DNA 損傷修復を促進することが明らかになり、その機能に注目が集まっている。本研究では、SIRT6 を活性化する食品の探索とその機能性を評価することを目的とした。
[方法]
腸管上皮のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。ヒト SIRT6 遺伝子のプロモーター領域を EGFP 発現ベクター中の CMV プロモーターと置換したレポーターベクターpSIRT6p-EGFP を作製し、これを Caco-2 細胞に導入することで、Caco-2 (pSIRT6p-EGFP)細胞を樹立した。当該細胞に食品成分を添加して、培養後の EGFP 蛍光強度を指標に一次スクリーニングを行った。SIRT6 増強活性が高かった食品成分については、定量 real-time PCR 法によって内在性 SIRT6 発現に対する効果の検証を行った。更に、SIRT6 の機能性として DNA 損傷修復活性に着目した。DNA 二本鎖切断を誘導するパラコートを添加し培養した Caco-2 細胞に、同定した食品成分を添加した後に、γ-H2AX を指標として DNA 損傷の量的変化を追跡した。さらに、相同組換え(HR)及び非相同末端結合(NHEJ)のレポーターベクターを導入した Caco-2 細胞を用いて、食品成分の HR 増強活性及び NHEJ 増強活性をフローサイトメトリーによって検証した。
[結果]
一次スクリーニング及び定量 real-time PCR 法によってポリフェノール 2 種類 (Fisetin, Oenothein B) において内在性 SIRT6 増強効果が認められたため、これらを SIRT6 活性化食品成分として同定した。また同定された食品成分を用いて、Caco-2 細胞における DNA 損傷修復促進効果を γ-H2AX を指標に検証した結果、いずれのポリフェノールも DNA 損傷修復を亢進することが明らかとなった。さらにいずれのポリフェノールも、Caco-2 細胞において HR 増強活性および NHEJ 増強活性を有することが明らかとなった。

SIRT6, DNA repair, polyphenol

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3B05p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟南 B05 会場

がん細胞に高い増殖阻害活性を示すアーユルヴェーダハーブの探索

Screening for ayurvedic herbs that inhibit the growth of cancer cells

○山田 なつき[1]、高氏 裕貴[1,2]、三木 健輔[1,2]、鮎澤 大[1,2]、藤井 道彦[1]([1]横市大生命ナノシステム、[2]イチバンライフ（株））
○Natsuki YAMADA[1], Yuki TAKAUJI[1,2], Kensuke MIKI[1,2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1]
([1]Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ., [2]Ichiban Life Corp.)

アーユルヴェーダは、およそ 5000 年以上前にインド亜大陸で発祥した不老長寿を目的とした伝統医療システムである。アーユルヴェーダは、病気の治療のみを目的としている対象療法ではなく、病気の根本原因を取り除き健康や不老長寿を目的とした生命や生き方そのものをとらえる科学であると考えられている。

アーユルヴェーダの治療では様々な天然物が用いられているが、その中でも最も一般的な治療薬はハーブ製剤である。インド亜大陸は世界で最も多彩で豊富な植物に富む地域であり、アーユルヴェーダでは数多くの植物が処方されている。効果的な植物は薬剤として多用されているが、その生理活性作用について、細胞レベルでの生理学的検証はほとんど行われてこなかった。しかし、最近になってアーユルヴェーダハーブに関する研究が行われるようになり、細胞レベルでの効果が報告され始めている。

私たちはアーユルヴェーダで処方されている植物約 200 種類を現地から取り寄せ、抽出液を作成した。そして、これまでの研究では抽出液を様々な細胞種に投与し、それらの細胞の増殖へ及ぼす効果を検討し報告してきた。本研究では、がん細胞の増殖を特異的に阻害するハーブの探索を試みた。具体的には、がん細胞としてヒト子宮頸部がん由来の細胞 HeLa、正常組織由来の細胞としてヒト正常線維芽細胞 TIG-7 を採用した。HeLa の増殖を阻害するが、TIG-7 の増殖に影響を与えないハーブを探索したので、その結果について報告する。

Ayurveda, herb, cancer

講演番号：3B06a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B06 会場

デルフィニジンのマイクロ RNA 発現調節による廃用性筋萎縮抑制作用

Delphinidin Upregulates miRNA Expression and Prevents Disuse Muscle Atrophy

○村田 希、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Motoki MURATA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】デルフィニジンはアントシアニジンの一種であり、糖や糖鎖と結びついた配糖体の形で花や果実の色素成分として植物中に存在しているが、抗がん作用や抗炎症作用を示す機能性食品成分として注目されている。骨格筋は人体で最大の組織であり、運動や代謝において重要な役割を果たしている。老化や寝たきりなどによる筋肉の使用量低下によって誘導される廃用性筋萎縮は、高齢化が進む現代における深刻な課題となっている。我々はこれまでに、デルフィニジンがマウスにおいて、尾懸垂誘導性の筋重量の低下を抑制することを見出した（*Biosci Biotech Biochem.* 2016; 80, 8: 1636–1640）。一方、ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA（miRNA）が様々な生命現象において重要な役割を担う新たな分子種として近年注目を集めている。そこで本研究では、miRNA ならびにその発現調節作用に着目し、デルフィニジンの廃用性筋萎縮抑制作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】分化させたマウス筋芽細胞株 C2C12 をデルフィニジン及び筋萎縮の誘導剤であるデキサメタゾンで処理後、筋萎縮関連因子 MuRF1、miRNA、転写因子の発現量をリアルタイム PCR ならびにウエスタンブロット法により測定した。
C57BL/6 雄性マウスの尾を固定（尾懸垂）し、後肢にかかる負荷を軽減することで廃用性筋萎縮を誘導した。尾懸垂実施の 1 週間前から尾懸垂中においてデルフィニジンを経口投与し、腓腹筋の重量を測定した。さらに、腓腹筋における MuRF1、miRNA、転写因子の発現量をリアルタイム PCR ならびにウエスタンブロット法により測定した。

【結果】C2C12 において、MuRF1 の発現を誘導するデキサメタゾンは MuRF1 の発現を抑制する miRNA である miR-23a 及びその転写因子である NFATc3 の発現を低下させた。一方、デルフィニジンは MuRF1 の発現上昇を阻害するとともに miR-23a 及び NFATc3 の発現低下を抑制した。尾懸垂を施したマウスの腓腹筋において、デルフィニジン投与により miR-23a の発現量が増加するとともに NFATc3 の発現も上昇していた。以上の結果より、デルフィニジンは NFATc3 の発現上昇を介して miR-23a 発現を誘導し、MuRF1 の発現を抑制することで筋萎縮を改善する可能性が示された。

Delphinidin, Muscle atrophy, microRNA

講演番号：3B06a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B06 会場

運動及びβ-ヒドロキシ-β-メチル酪酸とブラックジンジャー投与がサルコペニアに与える影響

The effect of exercise with β-Hydroxy-β-MethylButyrate and Black ginger supplementation on Sarcopenia.

○青木 海、今野 雅生、城本 淳、時野谷 勝幸、本多 克成、竹越 一博、大森 肇 (筑波大)
○Kai AOKI, Masaki KONNO, Jun SHIROMOTO, Katsuyuki TOKINOYA, Katsunari HONDA, Kazuhiro TKEKOSHI, Hajime OHMORI (Tsukuba Univ.)

【目的】加齢による筋量・筋力の低下をサルコペニアと呼ぶ. サルコペニアの発症機序としてはインスリン感受性の低下や慢性的な炎症などによる筋タンパク合成の低下や筋タンパク分解の亢進が考えられる. これまでにサルコペニアに対するアプローチとして, 運動の効果や機能性成分の効果の検討がなされている. 運動はメカニカルな外的刺激により筋タンパク合成を促すだけでなく, 加齢に伴い低下するインスリンの感受性を改善することにより, 筋タンパク合成の亢進をもたらす. 一方で機能性成分としては, 分岐鎖アミノ酸をはじめとするアミノ酸は筋タンパクの合成を亢進させる効果, 植物に含まれるフィトケミカルは抗炎症効果による筋タンパク分解の抑制効果を持つとされている. 今回, 我々は筋タンパク合成の向上効果や筋タンパク分解抑制効果が期待されるβ-ヒドロキシ-β-メチル酪酸(HMB)とブラックジンジャー(BG)の長期投与及び運動負荷を老化促進マウス(SAMP8)に行い, 筋タンパク合成系や筋タンパク分解系の因子に与える影響を検討した.

【方法】28 週齢の雄性 SAMP8 を Control 群, Exercise(Ex)群, HMB+Ex 群, BG+Ex 群, Combined+Ex 群の 5 群に分け, 44 週齢時までの 16 週間, それぞれの投与物を粉末混餌で与え,Control 群以外には 15m/min, 30 分, 週 5 日間のトレッドミル走を負荷した. また, 28 週齢と 36 週齢, 44 週齢時に握力試験を行い, 筋力を測定し,1 日後に解剖し, 腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋の筋湿重量を測定した. 腓腹筋を用いたウエスタンブロット法により, 筋タンパク合成関連タンパク質, qRT-PCR 法により筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼの遺伝子発現解析を行った.

【結果】28 週齢時と比較して 36 週齢時に筋力は Control 群で有意に低下したが, それ以外の群では低下がみられなかった. また, 腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋の筋湿重量は筋力と同様に Control 群で有意に低下した. 筋タンパク合成関連タンパク質の発現解析として Akt1 のリン酸化を測定した. 28 週齢時と比較して, Exercise 群, Combined 群の 36 週齢時で有意にリン酸化が増加していた. 一方で, E3 ユビキチンリガーゼである MAFbx 及び MuRF1 の mRNA 発現量は加齢に伴い有意に低下した. しかし, 運動負荷や HMB, BG を投与したことによる変化は見られなかった. このことから, 運動及び HMB, BG を投与することにより筋タンパク合成を亢進させる可能性が示唆された. しかしながら, 運動負荷や HMB, BG の投与は E3 ユビキチンリガーゼの遺伝子発現には影響を及ぼさなかった. そのため, 分解系への影響については他のタンパク分解経路を検討する必要がある. なお, 筋タンパク合成に関連するそのほかのタンパク質や 44 週齢時については現在解析を進めている.

Sarcopenia, Aging, SAMP8

講演番号：3B06a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B06 会場

育毛効果のある食品成分に関する研究
Functional evaluation of food components that promote hair growth

○松尾 花佳[1]、久保 智里[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院・シス生、[2]九大院・生資環、[3]九大院・農院)
○ Haruka Matsuo[1], Chisato Kubo[2], Yoshinori Katakura[3] ([1]Grad.Sch.Sys.Life.,Kyushu Univ, [2]Grad.Sch.Biores.Bioev.Sci.,Kyushu Univ, [3]Fac.Agric.,Kyushu Univ)

【背景・目的】

最近、テロメラーゼ触媒サブユニット（TERT）の上皮細胞における発現誘導が育毛を促進することが報告された。そこで本研究では、ヒト表皮ケラチノサイト由来 HaCaT 細胞を用いて、ヒト TERT 遺伝子プロモーターを活性化する食品成分を探索するとともに、HaCaT 細胞活性化の分子基盤を検証した。さらにマウスを用いた in vivo 試験により、その育毛効果を検証した。

【材料及び方法】

まず、*hTERT* プロモーターに制御されて蛍光タンパク質 EGFP を発現するベクターを作製し、HaCaT 細胞に導入し安定株を樹立した。各種食品成分を添加し培養した後、イメージングサイトメーター（IN Cell Analyzer 1000）を用いて EGFP の蛍光強度の変化を追跡し、各種食品成分の *hTERT* プロモーター増強活性を評価した。選定した食品成分については、HaCaT 細胞の内在性 *hTERT* 発現に対する効果、HaCaT 細胞の増殖に与える効果、毛周期・毛髪の成長に関わるシグナル経路に対する効果を検証した。

さらに、実際の育毛効果については、剃毛処理を行ったマウスの皮膚に上記食品成分を塗布し経過を観察することで評価した。

【結果・考察】

イメージングサイトメーターによる解析、リアルタイム PCR による内在性 *hTERT* 発現、育毛関連成長因子発現の検証、及び細胞増殖に対する効果から、2 種類のポリフェノールサンプルが育毛効果を有する食品成分として有望であると考えられた。これらポリフェノールは β-カテニンの活性化を介して TERT を活性化していることが明らかとなった。また、実際にマウスを用いた in vivo 試験により評価した結果、上記ポリフェノールは、コントロールと比較して顕著に育毛促進効果がみられ、さらに成長期の毛包や、皮膚の厚みの増加、増殖性細胞(Ki-67)及び $TERT^+$細胞の発現も確認できた。
以上より、本スクリーニング系が育毛促進物質の探索に有効であることが明らかとなった。

hair growth, hTERT, HaCaT

講演番号：3B06a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B06 会場

モリンガ葉抽出物の化粧品利用における可能性

Possibility of Moringa Leaf Extract Aiming a Cosmetic Product

○庄屋 雄二[1]、斉藤 憲二[1]、中村 紀夫[1]、坂下 真耶[1]、山津 淳史[1]、堀江 典子[1]、齋藤 洋子[2]、玉城 美根子[2]、金 武祚[1] ([1](株)ファーマフーズ、[2](株)シャルレ)
○Yuji Shoya[1], Kenji Saito[1], Toshio Nakamura[1], Maya Sakashita[1], Atsushi Yamatsu[1], Noriko Horie[1], Yoko Saito[2], Mineko Tamashiro[2], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Charle Co., Ltd.)

【背景と目的】

我々はモリンガ(*Moringa oleifera*)の高い成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物の生理機能に関する探索を行ってきた。その結果、モリンガ葉抽出物には高い「抗炎症作用」、「糖・脂質代謝作用」、「肌の抗老化作用」、「育毛作用」があることを見出した(2017、日本農芸化学会)。これら様々な働きの中から、本演題では「肌の抗老化作用」について、肌のターンオーバーの調整をキーワードとしたモリンガ葉抽出物の化粧品利用の可能性を探索したので報告する。

【方法】

モリンガ葉抽出物は、葉の破砕物をエタノールで抽出後、クロマト操作によりクロロフィル画分を除去することで調製した。

細胞はヒト繊維芽細胞株(Hs68)を使用し、ピオシアニンで処理することにより擬似的な老化状態を再現した。ここにモリンガ葉抽出物を各種濃度で添加し、MTT 法にて細胞増殖活性、リアルタイム PCR 法にて Sirtuin1(Sirt1)遺伝子発現量の解析を行った。更に Cell－Clock Dye(biocolor)を用いて、細胞周期の解析を行った。

【結果と考察】

Hs68 細胞株のピオシアニン処理によって、細胞増殖活性、及び Sirt1 遺伝子発現量を 20～40％減少させ、細胞周期も増殖期の細胞が減少することを確認した。

本条件下にて、モリンガ葉抽出物を添加すると濃度依存的に細胞増殖活性は増加し、25 μg/mL 添加時には正常細胞と同程度まで活性は回復した。Sirt1 遺伝子発現量においても、モリンガ葉抽出物の添加によって濃度依存的な遺伝子発現量の増強が確認された。また、細胞周期解析においても、ピオシアニンで処理された状態から細胞周期を正常化することが確認された。

一連の結果より、モリンガ葉抽出物は Sirt1 遺伝子活性化作用を通した細胞周期の活性化作用をもち、肌のターンオーバーの調整を行うことで抗老化作用を有することが確認でき、抗老化を目的とした化粧品利用が期待される。

Moringa, Cosmetics, Anti-aging

講演番号：3B06a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B06 会場

蜜花豆抽出物におけるヒト有効性試験による抗シワ効果の検証

Anti-wrinkle effect of *Spatholobus suberectus* extract on human effectiveness test.

○石田 和人[1]、草川 太郎[1]、石田 有希子[2]、斉藤 憲二[2]、昆 良子[2]、Binti Jasni Nur Nadia[2]、坂下 真耶[2]、内田 良一[2]、金 武祚[2] ([1](株)フューチャーラボ、[2](株)ファーマフーズ)
○Kazuto Ishida[1], Taro Kusakawa[1], Akiko Ishida[2], Kenji Saito[2], Ryoko Kon[2], Nur Nadia Binti Jasni[2], Maya Sakashita[2], Yoshikazu Uchida[2], Mujo Kim[2] ([1]Future labo Co., Ltd., [2]Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】

肌の弾性は真皮組織中のコラーゲンを主体とした細胞外マトリックスにより構築される。そのため、コラーゲンとその分解酵素の量的な平衡状態が破たんすると、肌の弾力が低下し、シワが生じる。そこで我々は、in vitro 試験によってコラーゲン分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP1）の機能阻害活性を見出した蜜花豆抽出物を化粧品に配合し、ヒトでの有効性について効果検証を行った。

【方法】

簡単な処方系のO／W型クリーム（プラセボ）と蜜花豆抽出物を一定量配合した同クリーム（試験品）を用意し、それぞれを半顔に塗布し続けた 0 ヶ月・1 ヶ月・2 ヶ月後の肌状態（眼下のシワ、目じりのシワ、眼下の色味、肌のきめなど）をスキンアナライザーにて測定し、二重盲検比較試験にてヒトでの有効性を評価した。

【結果】

プラセボと試験品を半顔に塗布し続けた結果、スキンアナライザーの経時観測にて目尻のシワおよび眼下のシワについて有意な改善を示す結果となった。蜜花豆抽出物は in vitro 試験においてコラーゲン分解酵素の発現阻害を根幹とするシワの予防効果に加え、光老化によるシワの改善効果が期待される可能性が示唆されており、今回の結果により、実際の化粧品に配合した場合においても、同様の改善効果が期待できる可能性を見出した。

Spatholobus suberectus, human effectiveness test, anti-wrinkle

講演番号：3B06a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B06 会場

食餌誘導性肥満モデルマウスを用いたトマトの酸化ストレス軽減効果の検討

The antioxidant effect of tomato juice in diet-induced obese mice

○若木 学、後藤 真生、橋本 直人、石川（高野） 祐子（農研機構・食研）
○Manabu WAKAGI, Masao GOTO, Naoto HASHIMOTO, Yuko TAKANO-ISHIKAWA (FRI, NARO)

【背景】近年、活性酸素種が生体に及ぼす酸化ストレスが様々な健康障害を惹起する機序が明らかとなり、体調改善の新たな戦略として活性酸素の除去が検討されつつある。そのような中、抗酸化能が高い食品の摂取が高齢者の体調を改善することが統計的に示唆された（Kobayashi S, et al., 2017）。しかしながら、生体内酸化ストレスの抑制に際して、摂食された食品成分が活性酸素種に直接作用、消去しているとは未だに確認されていない。そこで本研究では、食餌性肥満モデルマウスを用いて、食品の抗酸化能の酸化ストレス抑制への直接寄与の確認を目的として、検討した。
【実験方法】ORAC (oxygen radical absorbance capacity)または SOAC(single oxygen absorption capacity)を指標として抗酸化能を評価したトマト果汁とパルプ分の除去によりカロテノイド総量を低減したトマト果汁のそれぞれの凍結乾燥粉末を混餌（餌 1 g 当たり約 0.33mL 果汁相当を添加）した普通餌(AIN-93M)、高脂肪餌を調製し、C57BL/6J マウス（6 週齢、雄性）に 9 週間投与した。回収した血漿は、血液学検査に供するとともに酸化ストレスマーカーを測定した。また、肝臓組織へのマクロファージの浸潤をフローサイトメーターによる F4/80 および CD11c の発現解析によって評価した。
【結果・考察】遠心分離処理することで、トマト果汁の H-ORAC 値は 78.8 μmol TE/gDW から 52.3 μmol TE/gDW に、L-ORAC 値は 9.4 μmol TE/gDW から測定限界以下に、SOAC 値は 164.1 μmol α-Toc/gDW から 13.4 μmol α-Toc/gDW まで低下し、抗酸化能の低下が認められた。これらを混餌した餌を投与したマウスの平均摂水量はいずれの投与群でも差はなかったが、摂餌量は高脂肪食群において、普通食群よりも有意に高かった。9 週間投与後の体重および脂肪重量は高脂肪食群で普通食群より有意に高くなったが、果汁投与の影響は認められなかった。血液学検査値では、血中グルコース量、総コレステロール量、LDL-コレステロール量において、高脂肪食群は普通食群に比べて有意に高い値を示した。しかし、果汁摂取の有無、果汁の種類は血液学検査値に影響しなかった。また、肝臓へのマクロファージの浸潤を F4/80 陽性細胞を指標として解析したが、明らかな差は認められなかった。一方、血中酸化脂質マーカーである HODEs (hydroxyoctadecadienoic acids)量は、普通食群よりも高脂肪食群において高い値を示し、遠心分離果汁、未処理果汁の投与により下がる傾向が認められた。以上の結果より、本実験条件において、トマト摂取は高脂肪食摂取による肥満や高血糖は抑制しなかったが、酸化ストレス軽減に寄与していることが示唆された。

antioxidant, SOAC, ORAC

講演番号：3B06a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B06 会場

3 種類の麹菌を用いて調製した外皮を含む粒状穀類の麹と塩麹の抗酸化活性

Antioxidant activity of Koji and Shio-koji of whole-grain cereals prepared by using 3 species of koji mold

○韓 宝祥[1]、原 崇[2]、城 斗志夫[2] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農)
○Baoxiang HAN[1], Takashi HARA[2], Toshio JOH[2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】穀類の加工工程で廃棄されるヌカやフスマなどの外皮には、フェルラ酸やフィチン酸塩、アラビノキシラン、β-グルカンなどの機能性成分が豊富に含まれている。しかし、その多くは不溶性であり、その機能の活用には可溶化による利用効率の向上が不可欠である。古くから発酵食品の製造に使用されている麹菌は、高い酵素生産性や物質代謝能力を持つ微生物である。その物質代謝能力を利用し、穀類の外皮に含まれる不溶性の機能性成分を可溶化できれば、穀類の機能を十分活用した機能性食品の開発が可能になる。そこで本研究では、糠層を含む米と外皮を含む小麦及び大麦の粒状穀類を３種の麹菌で発酵させることで調製した麹と塩麹の抗酸化能を評価し、代表的抗酸化成分であるポリフェノール含量を測定した。
【方法】精米歩合 10%の白米、玄米、外皮を含む小麦と大麦を水に浸漬後、蒸煮した。これに種麹を接種し、37℃、7 日間発酵させることで麹を調製した。また、この麹に食塩、水を 10:3:13.5 (w/w/w) の割合で混ぜ、25℃で 7 日間発酵させ塩麹を調製した。各試料を凍結乾燥後、80%アセトンで抽出し、抗酸化能とポリフェノール量を測定した。抗酸化能は DPPH ラジカル消去活性で評価し、ポリフェノール量はフォリン-シオカルト法で測定した。種麹には３つの麹菌 *Aspergillus oryzae*（オリゼ）、*Aspergillus soyae*（ソーヤ）、*Aspergillus luchuensis*（ルチュエンシス）を用いた。
【結果】玄米や外皮のある粒状の小麦や大麦を蒸煮後、種麹を接種し麹の調製を試みた。小麦や大麦では外皮が麹菌の繁殖を妨げると考えられたが、7 日を要するものの十分に菌が繁殖した麹が得られ、塩麹も調製できた。麹の原料の穀類の抗酸化能を測定した結果、大麦の抗酸化能が最も高かった。これら穀類にオリゼを接種して麹を調製すると、白米、玄米、小麦で抗酸化能が増加したが、大麦では増加しなかった。また、オリゼの麹で塩麹を調製しても、著しい抗酸化能の増加は見られなかった。次にソーヤとルチュエンシスを穀類に接種し、得られた麹の抗酸化能を測定した。ソーヤの麹の抗酸化能はいずれの穀類でもオリゼと同程度であったが、ルチュエンシスの麹の抗酸化能は非常に高く、その活性はオリゼに比べ玄米で 4.8 倍、小麦で 8.1 倍、大麦で 3.4 倍高かった。これら発酵試料のポリフェノール含量を測定した。その結果、３種の麹菌全てにおいて抗酸化能と同様の傾向を示した。そこで各試料の抗酸化能とポリフェノール含量の相関を調べたところ、R^2=0.975 と非常に高い相関があることが明らかとなり、麹菌の種によらず麹や塩麹に含まれる抗酸化成分はポリフェノール化合物であることが示唆された。

cereals, koji mold, antioxidant activity

講演番号：3B06a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B06 会場

フキノトウエキスに含まれる抗酸化成分の同定および生体抗酸化性

Identification of antioxidant components in the extract from Japanese butterbur sprout and in vivo antioxidant activity of the extract

○近藤（比江森） 美樹[1]、上原 穂香[2]、新家 大輔[2]、新居 美香[2] ([1]徳島文理大人、[2]徳農技セ)
○Miki Hiemori-Kondo[1], Honoka Uehara[2], Daisuke Shinya[2], Mika Nii[2] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]TAFF TSC)

【目的】 フキノトウ(*Petasites japonicus*)は代表的な山菜の一つである。徳島県ではフキノトウの優良品種として「あわ春香」を選抜育成している。これまで、「あわ春香」の高付加価値化を目的として抗酸化性を検討し、*in vitro* において、「あわ春香」は先行育種のフキノトウと比較して高い抗酸化性を有することを明らかにしている。今回は、「あわ春香」から調製したフキノトウエキスに含まれる抗酸化成分の同定およびフキノトウエキスの酸化モデル動物を用いて *in vivo* における抗酸化性を検討した。

【方法】 2016 年の春に徳島県下で採取したフキノトウ「あわ春香」を凍結乾燥し、ミルにて粉砕した。粉砕試料に 10 倍量の 80%エタノールを添加し，37℃で 30 分間振盪抽出後、遠心分離により上清を得た。この操作を 3 回繰り返して得られた上清をエバポレーターにて濃縮乾固後、蒸留水に再溶解し、さらに遠心により得られた上清をフキノトウエキスとした。HPLC によりエキス成分を分離し、各成分の DPPH ラジカル消去活性を測定した。次いで、抗酸化活性が認められた成分を機器分析により同定した。*in vivo* 実験では、6 週齢の雄性 ICR マウスを 4 群に分け、試験群にはフキノトウエキス(4 および 8 g dry powder base/kg BW) および既知の抗酸化成分として(+)-catechin (0.25 mmol/kg BW)をゾンデにて投与した。対照群にはエキスの代わりに蒸留水を投与した。15 分後に 10 mg/kg BW の鉄を含む鉄ニトリロ三酢酸を腹腔内投与して強制的に酸化を誘導した。その 1 時間後に全血を採取して血漿を回収し、脂質過酸化のレベルを TBARS アッセイにより検討した。

【結果および考察】 フキノトウエキスに複数の抗酸化成分の存在を確認した。HPLC 分析、UV-Vis スペクトル、LC-MS および LC-MS/MS 解析の結果から、抗酸化成分として caffeic acid (CA)、5-caffeoylquinic acid (5-CQA)、fukinolic acid (FA)、3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA)、3,5- dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA)および 4,5-dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQA)を同定した。フキノトウエキスにおけるこれら化合物の DPPH ラジカル消去活性への寄与は、FA>3,5-diCQA>5-CQA >4,5-diCQA>CA>3,4-diCQA の順であった。*In vivo* では、高濃度用量のフキエキス投与群において、酸化誘導されたマウスの血漿 TBARS 値がコントロール群に対して有意に低値を示し、0.25 mmol//kg BW 投与のカテキンと同程度の効果を示した。以上の結果から、フキノトウエキスの主な抗酸化成分は FA であり、さらに当該エキスは酸化モデル動物の血漿 TBARS 値の上昇を抑制し、*in vivo* においても抗酸化性を発揮することが明らかになった。

Japanese butterbur sprout, antioxidant activity, fukinolic acid

発表責任者：近藤（比江森） 美樹（m-kondo@tks.bunri-u.ac.jp）

講演番号：3B06a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B06 会場

タモギタケ中の ergothioneine の抗酸化機序に関する研究（第 2 報）

The antioxidant mechanism of ergothioneine in golden oyster mushroom (2nd report)

○安藤 知佳[1]、大社 勇太[2]、三谷 茂樹[2]、森光 康次朗[1]([1]お茶大院・食品科学、[2]香栄興業株式会社)
○Chika ANDO[1], Yuta OKOSO[2], Shigeki MITANI[2], Yasujiro MORIMITSU[1] ([1]Dep. of Nutr. and Food Sci, [2]KOEI KOGYO Co., Ltd.)

【目的】

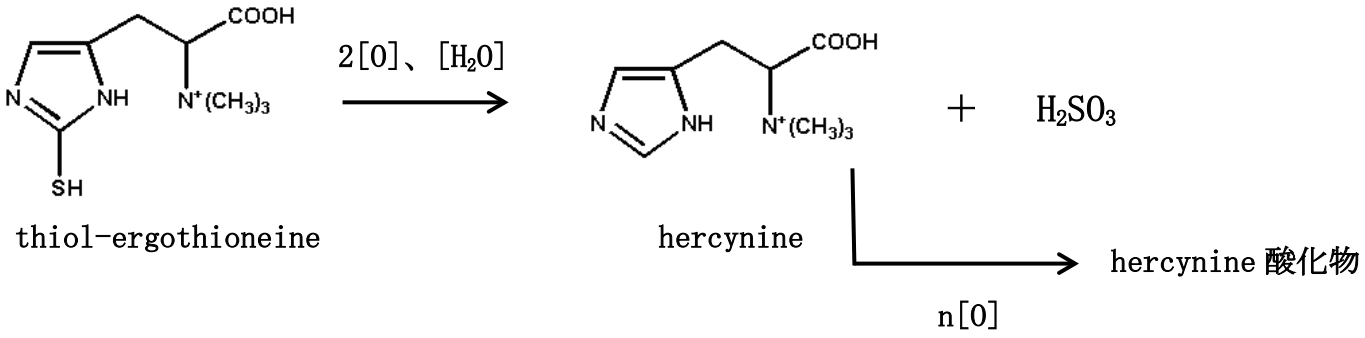
北海道や東北地方にて栽培されているタモギタケ（*Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus*）は、ergothioneine（EGT、thiol-histidine のベタイン）を多く含む食材である。EGT は水溶性であり、高い抗酸化性、抗炎症性などが注目されている。しかし、どのような反応機序で抗酸化性を示すのかについては明らかにされていない。そこで、EGT をタモギタケから抽出し、その抗酸化機序をモデル反応より明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】

これまでの研究より、EGT の主酸化生成物が hercynine であることを同定した[1)]。そこで、hercynine が更に酸化を受けて分解する可能性を考え、以下の検討を行った。

① EGT と過酸化水素を 37℃で 24 時間反応させ、hercynine が生成したことを LC-MS 分析で確認した。この反応液に更に過酸化水素を加え、37℃で 1～24 時間反応させた。反応液の LC-MS 分析の結果、反応開始直後と比べて 24 時間後では hercynine のピーク面積値が減少していた。hercynine も過酸化水素によって酸化分解すると考えられた。

② hercynine と過酸化水素の化学量論を明らかにするために、hercynine 標品の合成を試みている。histidine を原料とし、ホルムアルデヒドとヨードメタンを用いて histidine のアミノ基に 3 つのメチル基を付加する方法を採用し、現在 hercynine の反応収率を上げる条件を検討中である。



thiol-ergothioneine　　hercynine

1）坪田ら、日本農芸化学会 2017 年度大会要旨集 p. 46

Ergothioneine, Golden oyster mushroom, Antioxidant

講演番号：3B06a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B06 会場

黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用

Yellow Chinese chive extract increased intracellular glutathione levels

○川上 賀代子[1]、有澤 鮎美[1]、守谷 智恵[1]、槙野 祐子[2]、畑中 唯史[3]、坪井 誠二[1]([1]就実大薬、[2]岡山農業研、[3]岡山生物研)
○ Kayoko KAWAKAMI[1], Ayumi ARISAWA[1], Chie MORITANI[1], Yuko MAKINO[2], Tadashi HATANAKA[3], Seiji TSUBOI[1] ([1]Shujitsu Univ., [2]Res. Inst. Agric., Okayama, [3]RIBS, Okayama)

【目的】酸化ストレスは、糖尿病、動脈硬化、神経変性疾患をはじめ様々な疾病の発症や増悪化に関わると考えられている。食事により外部から抗酸化物質を摂取したり、生体内の抗酸化物質であるグルタチオン量を高めたりすることは、酸化ストレスが関与する疾病の治療や予防に有効であることが期待される。岡山県産農産物の細胞内グルタチオン上昇作用を調べた結果、黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用があることを見出した。黄ニラは青ニラの地上部を刈り取り、被覆資材で太陽光を遮断する軟化栽培による周年出荷の野菜であり、全国生産量の約 7 割を占めている岡山県の特産品である。本研究では、黄ニラの部位別と時期別の細胞内グルタチオン上昇作用の解析を行ったので報告する。
【方法】黄ニラは岡山県農林水産総合センター農業研究所において栽培されたニラ品種ミラクルグリーンベルト（武蔵野種苗園）を使用し、可食部（中間部）と廃棄部（出荷時に切断される先端および下端）に分けた。黄ニラは通常、太陽光を遮断して栽培し、収穫されるが、栽培期間の途中で 1～3 時間程度、太陽光に暴露（露光）することで葉の黄色が濃くなる。そこで，露光ありと露光なしの黄ニラを栽培した。黄ニラは 50%エタノールで抽出し、凍結乾燥して試料とした。ヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞を 48 時間培養後、各試料を 0.5 mg/mL になるように添加した。24 時間後に細胞を回収し、除タンパク後にグルタチオン量を DTNB 法を用いて測定した。細胞抽出液のタンパク量を測定し、タンパクあたりのグルタチオン量を算出した。また、総ポリフェノール量はフォーリン・チオカルト法を用いて測定した。比較対象としてミラクルグリーンベルトを露地栽培した青ニラも同様に 50%エタノールで抽出し、試料とした。
【結果】部位別で比較すると、総ポリフェノール量は廃棄部の方が可食部より約 2 倍高かったが、細胞内グルタチオン量は両部位ともにほぼ同じ値を示した。収穫時期別の細胞内グルタチオン上昇作用を調べた結果, 10 月収穫の黄ニラを処理することで細胞内グルタチオンが最も上昇することが分かった。総ポリフェノール量は 8 月が最も低く、10 月が高値を示した。収穫前に露光処理を行うと廃棄部でポリフェノール量の増加が見られたが、細胞内グルタチオン上昇作用は露光なしの方が高かった。さらに、同時期（8 月）に収穫した青ニラと黄ニラを比較すると、青ニラの総ポリフェノール量の方が 1.7 倍高かったが、細胞内グルタチオン上昇作用は黄ニラの方が高かった。以上の結果から、黄ニラの抗酸化活性に寄与している成分はポリフェノール以外の可能性が示唆された。現在、活性成分の同定を試みている。

yellow Chinese chive, glutathione

講演番号：3B06a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B06 会場

超浅煎り焙煎コーヒー豆に含まれるキサンチンオキシダーゼ阻害物質の探索

Investigation for xanthine oxidase inhibitors in super light roasted coffee beans

○本田 沙理[1]、福山 侑也[1]、増田 晃子[2]、増田 俊哉[1] ([1]大阪市大院生活、[2]四国大生活)
○Sari Honda[1], Yuya Fukuyama[1], Akiko Masuda[2], Toshiya Masuda[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Shikoku Univ.)

【目的】痛風は最近の食生活の変化により急激に罹患数が増えている生活習慣病の一つとされており，血液中に過剰な尿酸が析出することで発作が誘発される。2007 年，米国の Choi 等は，コーヒーを飲用することにより痛風発症が減少することを報告した。尿酸生成はプリン代謝系のキサンチンオキシダーゼ（XO）によることから，我々は，痛風軽減に寄与しうるコーヒーの XO 阻害活性物質を検討してきた。これまでに，阻害活性は焙煎したコーヒーのみに見られ，焙煎コーヒーの特徴成分である数種のクロロゲン酸ラクトン（CLs）とピロガロール（Pyr）を活性物質として同定した。また，Pyr は生体内条件の弱アルカリ条件下において酸化二量体のプルプロガリンへと変化することでより強力な活性を発現することも明らかにした [1)]。ところで，CLs はコーヒー生豆を焙煎することで，生豆主要ポリフェノール成分のクロロゲン酸類が脱水化して生成し，焙煎度合によって生成量が異なることが明らかになっている。Pyr もまた，焙煎による生豆成分分解物と考えられており，焙煎度合によって生成量が異なる可能性が考えられた。本研究では，コーヒー生豆を自家焙煎し，焙煎度合と Pyr の生成量を調べることを目的とした。その結果，Pyr 量が少ない焙煎度合の極めて低い（超浅煎り）焙煎豆でも活性が見られたので，その寄与成分について検討した。

【方法と結果】コーヒー生豆を 210, 230, 250 ℃でそれぞれ 10 min から 40 min 加熱した。豆の焙煎度は Roast Color Classification System の SCAA プレートを基準に明度で評価した。成分の抽出は Pyr 含有量を正確に評価するために，改良した熱水法で行った。各焙煎豆の成分分析の結果，210 ℃加熱においてCLs は加熱時間 10 min で最大量になった後，徐々に減少し，Pyr は焙煎に伴って徐々に増加して 30～40 min で一定となった。また，クロロゲン酸は加熱に伴って減少し，減少率は Pyr 生成率と連動していた。各焙煎豆の XO 阻害活性を調べると，Pyr 量が少ない加熱時間 10 min の超浅煎り焙煎豆の活性は，Pyr 量を 2 倍含む 20 min 加熱物と同等であった。そこで，超浅煎り焙煎豆成分を精査したところ，ODS カラムにおいて CLs 以降に溶出する非極性成分のうち，強力な活性を示す画分には 3 種のジカフェオイルキナ酸ラクトン（diCQLs）が含まれることが判明した。この結果，焙煎度合の低いコーヒー焙煎豆には，CLs, diCQLs などのラクトン類が多く含まれるが，ラクトン類はその後，焙煎に伴い減少し，Pyr が徐々に生成してくると考えられた。これら 3 種の diCQLs の構造と活性の違いについても併せて報告する。

1）Honda, S. *et al*. *Free Radic. Biol. Med.*, **106**, 228—235 (2017)

Roast coffee, Xanthine oxidase inhibitor, Dicaffeoylquinic acid lactone

講演番号：3B06a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B06 会場

カフェ酸の加熱反応により生成するビニルカテコール型キサンチンオキシダーゼ阻害剤の同定
Identification of vinylcatecol oligomers with xanthine oxidase inhibition produced from thermal treatment of caffeic acid

○福山 侑弥[1]、本田 沙理[1]、増田 晃子[2]、増田 俊哉[1] ([1]大阪市大院・生活、[2]四国大・生活)
○Yuya FUKUYAMA[1], Sari HONDA[1], Akiko MASUDA[2], Toshiya MASUDA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Shikoku Univ.)

【目的】キサンチンオキシダーゼ(XO)はプリン体代謝経路における尿酸の生成に関与している酵素である。過剰な尿酸産生は生活習慣病である痛風発症の原因となるため，XO 阻害活性を有する化合物の摂取には痛風予防の可能性が期待される。我々は，焙煎コーヒー豆において XO 阻害活性が発現することを報告し，焙煎コーヒー豆中に含まれる XO 阻害活性化合物としてクロロゲン酸ラクトン類，ピロガロールを同定している[1)]。しかし，XO 阻害活性を有する低極性画分に含まれる化合物に関しては未解決であった。今回，焙煎の様な高温加熱反応により，コーヒー生豆に豊富に含まれるクロロゲン酸から低極性 XO 阻害化合物が生成されるか，その可能性を検討した。
【方法と結果】クロロゲン酸を焙煎温度である 200 ℃で加熱し，生成物の XO 阻害活性を測定した。その結果，新たに阻害活性が発現した。また，クロロゲン酸構成化合物であるカフェ酸とキナ酸を同様にそれぞれ加熱したところ，カフェ酸加熱物にのみに 0.3 mg mL^{-1} で 60%を超える XO 阻害活性を確認した。したがって，クロロゲン酸の加熱による XO 阻害活性化合物の生成にはフェ酸構造が寄与していると考え、以下の実験を行った。まず，カフェ酸の加熱条件と XO 阻害活性の関連を検討するため，異なる温度条件下でカフェ酸を加熱して XO 阻害活性を測定した。比較的低温の 140 ℃加熱においても、活性が上昇して加熱時間 60 分でピークに達した。その生成物を HPLC 分析し，観察された多様なピーク物質の精製分離を試みた。その結果，ビニルカテコール構造を有する化合物 9 種を同定した。これらの化合物について，XO 阻害活性を測定したところ， 4 種がカフェ酸と比べて強力な活性を有することがわかった。本加熱物の ODS カラムを用いた HPLC 分析データにおいて，今回同定したビニルカテコールオリゴマーおよび構造未定の主要なピーク化合物は一箇所に集中していた。したがって、構造未定の多くの化合物はビニルカテコールオリゴマーであることが推測されたが，これらをすべて単離するのは困難で，構造決定には至らなかった。なお，Frank らは焙煎コーヒー豆中に数種類のビニルカテコールオリゴマーが苦味物質として特徴的に蓄積されることを報告している[2)] 本研究では，活性画分（またはピーク）をそのままアセチル化して，ポリスチレン系の GPC カラムを用い，分子量分布評価を行ったところ，どのピーク化合物もビニルカテコール二量体を超える分子量サイズであることが示唆された。

1）S. Honda and T. Masuda. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 7743—7749, 2016.
2）O. Frank *et al. J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1945—1954, 2007.

xanthine oxidase inhibition, vinylcatecol, chlorogenic acid

講演番号：3B06a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B06 会場

リポソームを用いた抗酸化反応系におけるロスマリン酸と各種抗酸化物の相互作用解析

Evaluation of synergistic and antagonistic effects between rosmarinic acid and some selected antioxidants in liposome peroxidation

○南 育子、鈴木 敦弓、井口 鈴音、小林 弘司、石川 洋哉（福岡女子大学　国際文理）
○ Ikuko Minami, Atsumi Suzuki, Suzune Inokuchi, Hiroshi Kobayashi, Hiroya Ishikawa (Fukuoka Women's University)

【目的】老化予防や生活習慣病予防を目的とした抗酸化物による生体膜の酸化抑制において、細胞膜内外に局在する抗酸化物間での相互作用ネットワークが注目されている。当研究室では生体膜モデルとして利用されるリポソームを用いて、各成分の抗酸化能を評価するとともに、抗酸化物 2 成分がリポソーム膜内外に局在した場合の相互作用を解析してきた。各種ハーブを対象とした研究では、スペアミント、ペパーミント、ラベンダー、レモンバームの熱水抽出物で高い活性を見出し、これら抽出物に含まれるロスマリン酸がα-トコフェロールと高い相乗効果を発現することを確認した。本研究では、さらにロスマリン酸と他の抗酸化物との相互作用に着目し、両者の相互作用(相乗・相加・相殺効果)を、薬剤の併用効果解析に汎用される Median effect analysis を用いて網羅的に解析した。
【方法】リポソームの作製には卵黄由来ホスファチジルコリン(PC)を用いた。PC を $CHCl_3$-MeOH に溶解後、窒素ガスで溶媒を留去し薄膜を形成させた後、0.01 M Tris-HCl buffer を添加し再溶解させた。続いて、ポリカーボネート膜（孔径 100 nm）を通過させることにより、均一なリポソームを調製した。なお、抗酸化物を膜内に局在化させる際は、リポソーム形成前に抗酸化物を事前に添加し、膜外に局在化させる際はリポソーム溶液作成時に添加した。抗酸化能測定は、リポソーム溶液に AAPH を添加し 3 時間反応させ、過酸化物量を TBA 法により測定した。結果から IC_{50} 値を算出し、Median effect analysis による併用効果解析を行い、CI 値（CI＞1：相殺、CI＝1：相加、CI＜1：相乗）で判断した。
【結果】リポソーム膜外溶液中にロスマリン酸と各種抗酸化物を共存させた結果、ミリセチン、EGCg との組合せでは、一部条件下で弱い相乗効果が認められたものの、ほとんどの組合せで相殺効果が認められ、特にケルセチン、カテキン類などとの組合せでは CI 値が～2 の強い相殺効果が確認された。
　一方、リポソーム膜内にロスマリン酸を、膜外に各種抗酸化物を局在させた場合、多くの組合せで相乗効果が認められた。特に、ミリセチンや没食子酸など分子内にピロガロール構造を有する化合物との組合せで極めて高い相乗効果(CI 値<0.5)が確認された。
　これらの結果から、リポソーム系における抗酸化反応では、膜外にロスマリン酸と各種抗酸化物が共存する場合には両者が拮抗し相殺効果を発現する傾向が強いこと、一方ロスマリン酸を膜内に、各種抗酸化物を膜外に局在させた場合には両者が相乗的に作用する可能性が高いことが明示された。また、ピロガロール構造を有する化合物がリポソーム膜外に局在することにより、膜内のロスマリン酸の抗酸化作用が極めて効率的に発現する可能性が示唆された。

Antioxidant, Combination Effects, Liposome

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：3B06a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B06 会場

ローズマリー抽出物であるカルノシン酸は破骨細胞の分化を抑制する
Carnosic acid, a rosemary extract, suppresses osteoclast differentiation
○真田 洋平[1,2]、味八木 茂[1,2]、渡邊 恵里花[1]、石川 正和[1]、中佐 智幸[1]、安達 伸生[1]([1]広島大医歯薬、[2]広島大病院)
○Yohei Sanada[1,2], Shigeru Miyaki[1,2], Erika Watanabe[1], Masakazu Ishikawa[1], Tomoyuki Nakasa[1], Nobuo Adachi[1] ([1]Hiroshima Univ Med., [2]Hiroshima Univ Hosp.)

【目的】超高齢化社会を迎えた本邦では、骨密度の減少を基盤病態とする骨粗鬆症の罹患者が増加しており、その数は 1300 万人以上と推測されている。要支援・要介護認定の原因疾患 4 位に転倒・骨折があげられることから、骨粗鬆症の予防は骨折による日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）の低下を防ぐために重要である。破骨細胞の分化や活性の促進による骨代謝バランスの破綻は、骨粗鬆症の発症要因となるが、近年では破骨細胞を標的とした優れた治療薬が登場している。しかしながら、これら治療薬を予防の観点から持続的に摂取することは困難であり、日々の食生活による骨粗鬆症の予防が求められている。本研究では、破骨細胞の分化を抑制する機能性食品成分を用いた骨粗鬆症の予防法の確立を目指し、抗酸化物質であるカルノシン酸(CA)に着目して破骨細胞の分化抑制作用を検討し、破骨細胞分化に関わる生体内調節機構の解明を試みた。
【方法】6 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの脛骨および大腿骨から骨髄由来細胞を採取し、10%ウシ胎児血清、M-CSF (50 ng/ml)を添加した MEM-α 培地で 20 時間培養した。浮遊細胞を回収し、7.5×10^4 cells/well となるように 48 well プレートへ播種して 3 日間培養した後、M-CSF（50 ng/ml）、sRANKL（100 ng/ml）を含む MEM-α 培地による分化誘導を行い、同時に CA を 1、5、10、25 μM 添加した。細胞増殖・毒性試験を行い、分化誘導後 5 日目に TRAP 染色を、さらに 0、8 時間、1、2、5 日目の Total RNA を回収し、定量 RT-PCR 法、および nCounter system を用いて mRNA、microRNA（miRNA）の発現解析を実施した。
【結果】CA 刺激による細胞増殖や毒性の影響は認められず、5、10、25 μM と CA 濃度依存的に多核の成熟破骨細胞数は減少した。破骨細胞マーカーであるカテプシン K の発現も同様に、CA 濃度依存的に抑制された。一方、抗酸化酵素である HO-1 の発現は、破骨細胞分化に伴い減少したが、CA 添加後 8 時間、24 時間において顕著に増加した。網羅的な miRNA 発現解析の結果、破骨細胞分化に関連した遺伝子群を標的とする miR-223、142-3p、146a-5p は、CA 刺激によって発現増加したが、破骨細胞における標的遺伝子が未知な miRNAs セットの発現も CA 添加後早期に増加した。
【結論】CA は、破骨細胞の分化初期において抗酸化酵素である HO-1 の発現を増加させ、分化を抑制すると考えられた。さらに CA は、miRNAs セットの発現を早期に増加させることで、標的遺伝子の発現調節を介して破骨細胞分化を制御する可能性が考えられた。今後は、破骨細胞における CA の作用機構の解明を目指すとともに、骨粗鬆症モデルマウスへの CA 投与による予防効果を検討する。

Carnosic acid, Osteoclastogenesis, Heme oxigenase 1

発表責任者：眞田洋平（ysanada@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3B06a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B06 会場

有用芳香族アミノ酸代謝物の発酵食品における分布と食品微生物による生産性に関する研究

Study on distribution of aromatic amino acid metabolites in fermented foods, and their productivities by food microorganisms.

○木村 優花[1]、青木 玲二[2]、高山 喜晴[2]、鈴木 チセ[2]、鈴木 義人[1]([1]茨城大農、[2]農研機構・畜産部門)
○Yuka KIMURA[1], Reiji AOKI[2], Yoshiharu TAKAYAMA[2], Chise SUZUKI[2], Yoshihito SUZUKI[1]
([1]Ibaraki Univ., [2]NARO)

【目的】

芳香族乳酸や芳香族ピルビン酸等の芳香族アミノ酸代謝物は，抗酸化作用や抗炎症作用を有する。食品成分タンパク質に由来するアミノ酸が、乳酸菌や酵母等により代謝されることで，芳香族アミノ酸代謝物が生産される可能性を考え，発酵食品を中心とした食品中に含まれる芳香族アミノ酸代謝物量の解析を行った。また，発酵微生物の代謝機能の改変を通して，更に高機能な発酵食品や発酵飲料の開発につながる情報を得ることを目的に，経時変化等の代謝特性の解析を行った。

【方法・結果】

１．食品中含有量

液体試料はそのまま分析し，固体試料はメタノール中で破砕，抽出を行った。芳香族乳酸類はそのまま LC-MS/MS により測定した。芳香族ピルビン酸類は cysteamine と反応させ thiazolidine 誘導体として測定した。牛乳，オオムギ種子，イネ種子，ダイズ種子，タケノコ等と比較し，それらを原料とするヨーグルト，チーズ，ビール，日本酒，納豆，メンマなどの発酵食品や発酵飲料からは，極めて高濃度の芳香族アミノ酸代謝物が検出された。ビールや日本酒など，酵母を用いた発酵飲料では芳香族乳酸に比べて芳香族ピルビン酸の内生量が高く，一方で，乳酸菌由来の発酵食品では芳香族乳酸の内生量が高いことから、酵母では芳香族アミノ酸から生成した芳香族ピルビン酸が比較的安定に蓄積するのに対して，乳酸菌では芳香族ピルビン酸がさらに芳香族乳酸へと代謝されたものと考えられた。

２．経時変化

乳酸菌 4 株(*Pediococcus acidilactici* D57, *Lactobacillus plantarum* P4, *Lactobacillus paraplantarum* TP2, *Lactobacillus rhamnosus* L-52)に関して 0~48 時間，*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 235 に関して 0~3 日における培養液中の芳香族アミノ酸代謝物の量を測定した。乳酸菌では芳香族ピルビン酸濃度は 9~12 時間でピークを迎え，それ以降は減少傾向を示した。芳香族乳酸濃度は時間が経つにつれて増加する傾向が見られた。一方，酵母では芳香族ピルビン酸濃度は全体として乳酸菌よりも高い値を示した。

現在，酵母における芳香族アミノ酸から芳香族ピルビン酸への変換酵素に着目し，酵素遺伝子欠損株や過剰発現株における芳香族ピルビン酸類の生産性の解析を進めている。

＊本研究の一部は、内閣府総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

Aromatic pyruvate, Aromatic lactate, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3B06p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B06 会場

乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC と菌体外多糖（EPS）の線虫 *C. elegans* に対する寿命延長効果

Effect of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC and exopolysaccharide (EPS) on longevity of *Caenorhabdtis elegans*

○小阪 英樹[1]、小村 智美[2]、戸田 登志也[1]、西川 禎一[3]([1]フジッコ株式会社、[2]奈良女子大・食物栄養、[3]大阪市大院・生活科学)
○Hideki KOSAKA[1], Tomomi KOMURA[2], Toshiya TODA[1], Yoshikazu NISHIKAWA[3] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]Nara Women's Univ., [3]Osaka City Univ.)

【目的】
長寿地域であるコーカサス地方を発祥とする「カスピ海ヨーグルト」の生産に用いられる *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC（以下 FC）は、その発酵中に菌体外多糖（以下 EPS）を産生する。これまで FC 及び FC が産生する EPS がもつ様々な生理作用が報告されているが、寿命そのものに与える影響は報告されていない。そこで、老化や生体防御の研究において有用なモデル生物である線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用い、FC 及び EPS の給餌が寿命に及ぼす影響を調べた。

【方法】
同時期に孵化した線虫（野生株 N2）に対し、大腸菌 OP50 株（OP50）を餌として線虫育成用寒天平板上で 3 日齢まで飼育した。その後、FC の給餌に切り替えた群と、OP50 給餌群とでその寿命と運動性を比較、生存分析を行った。また、寿命延長の機構解明のため、*daf-16* または *skn-1* の変異株を用い、野生株と同様に生存分析を行った。EPS については、リポソームに包含させてマイクロカプセルを作製し、OP50 と合わせて給餌した。リポソームに水を包含させたマイクロカプセルと OP50 を合わせて給餌した対照群と寿命を比較した。

【結果】
FC 給餌群の寿命は OP50 給餌群に比べて有意に長かった。また、FC 給餌群は老化による運動性の低下を抑制した。*daf-16* 変異株は野生株と同様に FC 給餌で有意に寿命が延長したが、*skn-1* 変異株は野生株と異なり、FC 給餌群と OP50 給餌群で寿命に差がなかった。このことから、FC 給餌は p38MAPK 経路を介して線虫の生体防御機能を賦活し、寿命を延長させる可能性が示唆された。EPS 給餌の影響については現在検討しており、合わせて報告する。

Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, longevity

発表責任者：小阪 英樹（h-kosaka@fujicco.co.jp）

講演番号：3B06p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B06 会場

遊離脂肪酸によって生じる細胞老化に対するダイゼインの効果について
Effect of daidzein on free fatty acid-induced cell senescence
○三谷 塁一[1]、片山 茂[1,2]、中村 宗一郎[2] ([1]信州大・先鋭領域融合、[2]信州大・総合理工(農学専攻))
○Takakazu MITANI[1], Shigeru KATAYAMA[1,2], Soichiro NAKAMURA[2] ([1]Shinshu Univ. ICCER, [2]Shinshu Univ.)

【目的】肥満は先進国だけでなく、多くの発展途上国でも増加しており、肥満によって誘発される 2 型糖尿病や脂肪性肝疾患、認知機能低下といった肥満関連疾患の増加が世界的な問題となっている。こうした肥満関連疾患の発症は、脂肪組織から分泌される生理活性物質が原因とされている。非アルコール性脂肪肝の発症の要因として、脂肪組織から過剰に分泌された遊離脂肪酸が、肝細胞の細胞老化を促すことが挙げられる。つまり、肥満状態においても、遊離脂肪酸による細胞老化を抑制することで、脂肪性肝疾患を緩和できると考えられる。本研究では、大豆イソフラボンの一種であるダイゼインが肝細胞の細胞老化に及ぼす影響とその作用機構について解析した。
【方法】ヒト肝がん細胞（HepG2）に遊離脂肪酸（0.5 mM）とダイゼイン（10 μM）を処理し、細胞の老化レベルを老化細胞で発現が増加するβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を蛍光値として測定した。細胞透過性プローブの 2',7'-dichlorofluorescin diacetate を HepG2 細胞に処理し、遊離脂肪酸とダイゼインが細胞内の活性酸素種の蓄積に及ぼす影響を調べた。FOXO を組込んだルシフェラーゼレポーターベクターを用い、FOXO の転写活性を測定する方法を用いた。
【結果および考察】各遊離脂肪酸を HepG2 細胞に処理したところ、パルミチン酸が細胞老化の指標であるβ-ガラクトシダーゼの活性を増加し、その活性増加はダイゼインの添加によって抑制された。また、遊離脂肪酸誘導の細胞老化は、抗酸化剤によって抑制されたことから、ダイゼインによる細胞老化の抑制にも抗酸化活性化が関与していることが示唆された。ダイゼインは抗酸化酵素である SOD2 と Catalase の発現を遺伝子レベルで増加したが、SOD1、NQO1、HO-1 といった抗酸化酵素の発現には影響を示さなかった。フォークヘッド型転写因子である FOXO ファミリーは抗酸化酵素の発現を調節する。ダイゼインは FOXO の転写活性を濃度依存的に亢進した。FOXO3a をノックダウンすると、ダイゼインによる SOD2 と Catalase の遺伝子発現の誘導は抑制され、抗老化作用も減弱することが示された。また、FOXO3a の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した結果、ダイゼインによって核内に FOXO3a が蓄積していることも明らかにされた。FOXO3a は様々な翻訳後修飾を受ける。中でもアセチル化修飾は、核外輸送を促進する。免疫沈降法による解析結果から、ダイゼインは FOXO3a の脱アセチル化を誘導することが示された。以上の結果をまとめると、ダイゼインは FOXO3a の脱アセチル化を誘導することで抗酸化酵素の発現を亢進することが示された。それによって遊離脂肪酸による活性酸素種の蓄積を減少し、細胞老化を抑制していると考えられる。

Daidzein, antioxidant, senescence

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B06p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B06 会場

ヒストンのアセチル化を介した梅リグナンによる線虫の寿命延長効果
Lignans extends lifespan via histone acetylation in Caenorhabditis elegans
○名取 貴光、遠山 千晶（山梨学院大健康栄養）
○Takamitsu Natori, Chiaki Toyama (Yamanashi Gakuin Univ.)

最近、ヒストンタンパク質のアセチル基を除去する酵素であるヒストン脱アセチル化酵素（Hdac）の活性を阻害すると線虫やショウジョウバエの寿命が延長されることが明らかとなった。このヒストンのアセチル化の調節は、代謝調節や個体寿命、疾患予防に関わることが報告されており、寿命延長に関わる遺伝子の発現がエピジェネティックな調節を受けている可能性が考えられる。また興味深いことに、野菜や果物に豊富に含まれるポリフェノール類に Hdac の活性を調節する効果のあることが報告されている。このことから、野菜や果物に由来するポリフェノールなど食品成分に Hdac 活性の調節を介した寿命延長効果のある可能性が考えられる。これまでにウメ由来成分には、抗酸化作用や抗炎症作用、疲労回復効果など、多くの効果が報告されているが寿命延長効果については知られていない。そこで本研究では、ウメ含有成分に新規な機能を見出すべく、山梨県で栽培されている甲州小梅を用いてヒストンアセチル化を介した寿命延長効果の有無について検討を行った。

甲州小梅から得たメタノール抽出液を各種溶媒で分画し、蛍光ペプチドアッセイ系を用いて Hdac 活性に対する影響を検討したところ、ジクロロメタンとブタノール画分に有意な阻害活性が確認された。また、このジクロロメタン画分には顕著な線虫の寿命延長効果がみとめられた。そこで次に、HPLC 分析により寿命延長効果を発揮している候補分子の同定を試みた。検討の結果、寿命延長の候補分子としてリグナン類（ピノレシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノール、シリンガレシノール）を得た。これらリグナン類は線虫の寿命を有意に延長したため、リアルタイム PCR 法による遺伝子解析を行ったところ、hsp70、sod-1、gcs-1、pmk-1 の発現が増強されていた。また、トランスジェニック線虫を用いて転写調節因子 skn-1 の局在を蛍光観察法により確認したところ、リグナン類を添加した際に skn-1 の核内移行が観察された。pmk-1 は skn-1 のリン酸化に関与する酵素であり、skn-1 は gcs-1 のプロモーター領域に結合部位をもつ可能性が示されている。従って、これらリグナン類は、skn-1 シグナル系を活性化させて老化防止に関連する遺伝子の発現を増強し寿命延長を導いていると考えられる。

lignan, lifespan, histon deacetylase

講演番号：3B06p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B06 会場

糖質制限食の長期摂取が老化に与える影響

Influence of the long-term intake of carbohydrate-restricted diet on senescence

○捨田利 望実、山本 和史、都築 毅（東北大院・農）
○Nozomi SHATARI, Kazushi YAMAMOTO, Tsuyoshi TSUDUKI (Tohoku Univ.)

【目的】老化とは加齢依存的に様々な組織で機能が低下する現象であり、この老化を遅延し、高齢者の QOL を維持する方法が切望されている。そのため、老化遅延を目指した食事や食品の研究が広く行われている。一方、低炭水化物・高タンパク質食は糖質制限食として知られている。糖質制限食とは食事の量を減らすことなく炭水化物の量を制限し、その分をタンパク質や脂質などで補う食事である。糖質制限食は内臓脂肪を減らす効果が報告されたことで注目され、メディアでも度々紹介されている [1]。しかし、長期の糖質制限を行ったマウスにおいて心血管に悪影響を及ぼすことが報告されている [2]。このような背景の中、糖質制限食の長期摂取における安全性に疑問が持たれている。そこで本研究では、長期間の糖質制限が老化にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、老化促進モデルマウスである SAMP8 マウスを用いて糖質制限食がマウスの老化にどのような影響を与えるかを検討することとした。

【方法】SAMP8 マウス（3 週齢、雄性）を 1 週間の予備飼育後、通常飼育食（AIN-93G）を与える CO 群、高脂肪食（AIN-93G のコーンスターチの一部をラードとコレステロールに置換した食餌）を与える HF 群、糖質制限食（高脂肪食のコーンスターチをすべてミルクカゼインに置換した食餌）を与える LC 群の 3 群に分け、55 週齢まで自由摂食させた。48 週齢時に見た目の老化をグレーディングテストを用いて評価した。飼育期間終了後、12 時間絶食し、血清や様々な臓器を採取し、各種分析に供した。

【結果】グレーディングテストの結果より、糖質制限食群は通常飼育食群と比べて被毛の艶の悪化、皮膚の粗造成の増加、脱毛、脊髄の前後湾曲の増強が見られ、見た目の老化が有意に進行していた。見た目の老化が進行していたことから、皮膚の老化が進行している可能性が考えられたので、皮膚の組織学的観察を行った。その結果、糖質制限食群は通常飼育食群と比べて表皮が薄くなり、皮膚の老化の有意な進行が見られた。また、生存率に有意差はなかったが、糖質制限食群は他の群と比べて、寿命が短い傾向があった。加えて、糖質制限食群は通常飼育食群や高脂肪食群に比べて脾臓の肥大化が見られ、肝臓と脳の過酸化脂質量（TBARS）が有意に高値を示した。以上により、糖質制限食はマウスの酸化ストレスを増加させ、皮膚や見た目の老化を促進し、寿命を短縮することが示された。

[1] Shai I. et al., *N Engl J Med*, 2009.
[2] Tatiana Bedarida, et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 2014.

SAMP8, carbohydrate-restricted diet, senescence

講演番号：3B06p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B06 会場

培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える

Effect of the quantity of amino acids in medium on induction of cellular senescence

○高氏 裕貴[1,2]、山田 なつき[1]、鮎澤 大[1,2]、藤井 道彦[1]（[1]横市大生命ナノシステム、[2]イチバンライフ（株））
○Yuki TAKAUJI[1,2], Natsuki YAMADA[1], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ., [2]Ichiban Life Corp.)

細胞老化は細胞がストレスに曝された際に起こる細胞応答の一つであり、細胞が肥大化・扁平化し、不可逆的に増殖を停止する現象である。近年、細胞老化は個体老化やがん化などに深く関わっていることが明らかになってきている。これらのことから、細胞老化の制御機構を解明することは健康長寿の実現に有用である。今までに、多くの細胞種から様々な手段によって細胞老化が誘導されてきたが、すべての老化細胞で DNA 複製の遅滞と細胞膨張は共通して観察される。我々は、老化細胞では増殖細胞と比較して DNA 量に変化はないが、RNA 量とタンパク質量は数倍に増加していることを見出し、このような高分子の不均衡で細胞内に高分子が過剰に蓄積することによって細胞膨張・核膨張が引き起こされ、細胞老化が起こると考えた。そして、我々は、タンパク質合成阻害剤を用い、細胞質での全タンパク質の部分的な合成制限が細胞老化および個体老化を抑制することを明らかにした。本研究では、培地中アミノ酸量を変化させることでタンパク質合成を制御し、細胞老化の誘導を制御できるかを検証した。その結果、培地中アミノ酸量を減少させると老化誘導が抑制され、増加させると老化誘導が昂進することを見出した。

cellular senescence, amino acids, protein synthesis

発表責任者：高氏裕貴（takauji@yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：3B06p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B06 会場

マウス加齢性難聴を抑制する食品素材の探索

Screening for foods delaying age-related hearing loss in mice

○大池 秀明[1]、木元 広実[2] ([1]農研機構・食品研、[2]農研機構・畜産研)
○Hideaki OIKE[1], Hiromi KIMOTO[2] ([1]NFRI/NARO, [2]NILGS/NARO)

動物の主要な老化現象の一つに聴力の低下（加齢性難聴）が挙げられる。ヒトの場合、かなり若い時期から高音域の聴力は低下することが知られており、可聴限界付近の高音であるモスキート音は、10 代の若者には聞こえるが、多くの人は 20 代あたりで聞こえなくなる。つまり、20 代付近から、可聴限界は加齢とともに下がってくることから、老化現象としては各段に若い時期から検出が可能である。これはヒトに限らず、多くの動物で共通しており、実験マウスにおいても、加齢に伴う進行性の聴力低下が検出可能である。我々は、C57BL/6J マウスを利用して、加齢性難聴の進行を遅延させる食品素材を発掘するため、農産物素材 42 種類および乳酸菌８種類の合計 50 素材（一部重複あり）についてスクリーニング評価を実施したので報告する。

【方法】オスの C57BL/6J マウスを購入し、1 群あたり 8 匹（４匹×２ケージ）に分け、3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢までの 3 ヶ月間、標準精製飼料（AIN93G）に農産物の凍結乾燥粉末を 5-20%、もしくは、乳酸菌の乾燥死菌粉末を 0.05%添加した飼料を与えて飼育した。延べ５回の試験タームに分けて、42 種類の農産物素材および８種類の乳酸菌添加飼料を摂食させ、6 ヶ月齢になったところで、聴性脳幹反応試験（ABR）により、8, 16, 24, 32 kHz の聴力をそれぞれ評価した。５回の試験タームにおいて、それぞれ１群をコントロール群として、農産物もしくは乳酸菌素材を添加していない AIN93G を摂食させ、試験素材を含む群とコントロール群との聴力の比較により、加齢性難聴の進行度を評価した。

【結果】統計的有意水準を 5%に設定した場合、試験を実施した 50 素材のうち 3 素材を摂取させた群については、コントロール群よりも有意に良い聴力を示した（農産物 2 素材: p=0.018, 0.031、乳酸菌１素材: p=0.001)。8 素材（農産物 5 素材、乳酸菌３素材）については、ｐ値が 0.05～0.15 の範囲内にあり、弱い効果がある可能性が示唆された。ただし、そのうちの１素材（農産物）については、摂餌量、体重が有意に減少しており、カロリー制限による効果である可能性も考えられた。その他 39 素材については、効果がなかったものと判定した。

【展望】農産物素材や乳酸菌には、何らかのアンチエイジング効果が期待されるものが多いが、今回の結果から、ごく少数ではあるが、食品素材そのものの長期摂取により、マウスの加齢性難聴の進行を抑制できるものが見出された。最近、ヒトの疫学調査から、認知症の最大予防可能因子は難聴であるとの報告もなされており（Lancet 2017)、今後、ヒトへの応用が期待される。

※本研究成果は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（27008A）によるものです

age, hearing loss, mouse

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：3B06p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B06 会場

カルノシンによる腸管アンチエイジングとその分子基盤
Molecular mechanisms for carnosine-induced intestinal anti-aging

○尾上 詩織[1]、藤井 薫[3]、佐藤 三佳子[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院シス生、[2]日本ハム、[3]九大農院)
○Shiori ONOUE[1], Kaoru FUJII[3], Mikako SATOU[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad.Sch.Systems life.Sci.kyushu Univ., [2]NH foods ltd, [3]Fac.Agric.kyushu.Univ)

【目的】カルノシン(β-Ala-His)はイミダゾールジペプチドの一種であり、ヒト介入試験において、脳の認知機能を改善するという結果が出ていることから、アンチブレインエイジング食品としての効果が期待されている。今回我々は、カルノシンの経口摂取を想定し、腸管から吸収された場合の機能性の解明を目的として研究を行っている。

【方法】本研究においては、ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。カルノシンを添加した Caco-2 細胞内の Ca^{2+}動態については、Calcium Kit-Fluo4 および IN Cell Analyzer 1000 を用いて追跡した。AMPK の活性化は WB により評価した。PKA 活性と CREB のリン酸化は、WB を使用して測定した。
SIRT1 発現は qRT-PCR により追跡し、NAD^+量は NAD^+/NADH Quantification Colorimetric Kit および蛍光プレートリーダーを用いて測定した。PGC-1α は、IP-WB 法によりそのアセチル化レベルを評価した。ミトコンドリア量は、MitoTracker 染色を用いた定量、及び PCR によるミトコンドリア DNA(mtDNA)のコピー数測定により評価した。

【結果】まず、細胞内の Ca^{2+}レベルをモニタリングした結果、カルノシンは Caco-2 細胞内の Ca^{2+}量を増加させることが明らかとなった。次に、カルノシンは AMPK を活性化するとともに、細胞内 NAD^+量は増強した。さらに、NAD^+量増大に伴う SIRT1 の活性化により PGC-1α の脱アセチル化が亢進し、その結果としてミトコンドリアの数および mtDNA のコピー数の増加が認められた。また、カルノシンが PKA を活性化し、また CREB のリン酸化を促進することが明らかになった。以上の結果から、カルノシン→Ca^{2+}→AMPK→NAD^+→SIRT1→PGC1α→ミトコンドリア生合成増強を、また、cAMP→PKA→CREB→PGC-1α→ミトコンドリア生合成増強を実現することが明らかとなった。

carnosine, mitochondria, Caco-2

講演番号：3B06p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B06 会場

カルノシンの腸管バリア増強効果

Carnosine augments intestinal barrier

○篠崎 諒介[1]、大津 出[1]、藤井 薫[3]、佐藤 三佳子[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院生資環、[2]日本ハム、[3]九大院農院)
○Ryosuke SHINOZAKI[1], Izuru OHTSU[1], Kaoru FUJII[3], Mikako SATO[2], Yishinori KATAKURA[3] ([1]Grad Sch Biores Bioenv Sci, Kyushu Univ, [2]NH Foods Ltd, [3]Fac Agric, Kyushu Univ)

目的
イミダゾールジペプチドの 1 種カルノシンは β-アラニンと L-ヒスチジンからなるジペプチドであり、鶏ムネ肉に多く含まれるとともに、ヒトの筋肉や脳にも多く存在している。生体内においては、緩衝作用、抗糖化作用、抗酸化作用、抗疲労効果を有することが知られており、最近ではヒト介入試験の結果から記憶機能改善効果を有することが報告されている。そこで本研究では、カルノシンによる腸管機能活性化に焦点を当て、カルノシンが腸管バリア機能に及ぼす影響を解析することを目的とし研究を行った。
方法
ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を腸管バリア解析のためのモデル細胞として用いた。腸管バリア機能は、傍細胞経路を評価する経上皮電気抵抗（Transepithelial Electrical Resistance: TER）試験及びタイトジャンクション構成タンパク質の発現解析により検証した。Caco-2 細胞の分化誘導とともにカルノシンを添加し、24 時間間隔で TER 値を 15 日間測定した。また分化誘導後の Caco-2 細胞にカルノシンを添加し、TER 値の変化を追跡した。タイトジャンクション構成タンパク質の発現は、定量 RT-PCR 法及びウェスタンブロッティング法により検証した。また、腸管バリア機能の経細胞経路を評価するために Dextran 透過試験を行った。
結果
未分化状態からカルノシンを添加しつつ分化誘導した Caco-2 細胞の TER 値は、添加していないものと比べて有意に増大していた。特に、10 mM カルノシンを添加した Caco-2 細胞の TER 値は大きく増大していた。また、分化後からカルノシンを添加した Caco-2 細胞の TER 値は 5 mM カルノシン添加で増大していた。さらに、定量 RT-PCR の結果、カルノシンによってタイトジャンクション構成タンパク質の発現が有意に増大することが明らかとなった。以上の結果から、カルノシンが腸管上皮細胞におけるタイトジャンクション構成タンパク質の発現増強を通じて、バリア機能を増強していることが明らかとなった。

Carnosine, Tight junction, TER

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3B06p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟南 B06 会場

Pyridoxamine による網膜色素上皮細胞保護効果の検証と機構解析
Cytoprotective action of pyridoxamine against cell death in human retinal pigment epithelial cells
○山下 知佳[1]、井出 涼子[2]、甲斐 建次[2]、須山 享三[3]、赤川 貢[2] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大院・生命環境、[3]東北大院・医学)
○Chika Yamashita[1], Ryoko Ide[2], Kenji Kai[2], Kyozo Suyama[3], Mitsugu Akagawa[2] ([1]College of Life & Environ. Adv. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Grad. Sch. of Med., Tohoku Univ.)

【目的】加齢黄斑変性は, 加齢に伴い網膜中心部の黄斑に障害が生じることで視力低下を引き起こし, 深刻なケースでは視力の喪失をもたらす難治性疾患である. 欧米では成人の失明原因の第 1 位であり, 我が国でも高齢化社会の到来とともに患者数が急増している．発症要因として，加齢に伴う all-*trans*-retinal (a*t*Ral) 代謝の衰弱・遅延によって a*t*Ral 濃度が上昇し，黄斑部に存在する網膜色素上皮細胞に a*t*Ral 由来の蛍光性加齢色素 (リポフスチン) が蓄積することで，アポトーシスが惹起されるというメカニズムが示唆されている．我々は，2 分子の a*t*Ral がタンパク質中の Lys 残基の ε-アミノ基に付加して，蛍光性 4 級ピリジニウム化合物 A2L が生成することを見出している．一方，ビタミン B_6 化合物である pyridoxamine (PM) は反応性の高いアミノ基を有しており，脂質過酸化やアミノカルボニル反応の過程で生じるカルボニル化合物を自身のアミノ基を介して捕捉し，除去することにより，糖尿病合併症の発症を予防し得ることが報告されている．このような背景から a*t*Ral とタンパク質のアミノカルボニル反応に対して PM が阻害効果を発揮するのではないかと考えた. そこで本研究では, PM によるリポフスチン形成阻害および網膜色素上皮細胞保護効果を検証し，その機構解析を行うことを目的とした.
【方法と結果】PM の共存下において a*t*Ral と N_α-Boc-Lys をインキュベートし，Boc-A2L の生成を蛍光 HPLC によって分析した．その結果，PM は濃度依存的に Boc-A2L の生成を抑制することが明らかになった．同様に a*t*Ral と BSA を PM の共存下においてインキュベートし，SDS-PAGE で分離後に蛍光スキャナーで解析したところ，PM が濃度依存的に BSA の蛍光化を抑制することが判明した．PM が a*t*Ral 修飾によるタンパク質のリポフスチン化を効果的に阻害することを確認できたため，ヒト由来網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) を用いて細胞レベルでの検証を行った．PM 共存下で ARPE-19 細胞に a*t*Ral を暴露し, 蛍光顕微鏡および蛍光スキャナーを使用してリポフスチン形成を評価したところ, PM 濃度依存的なリポフスチン形成の阻害とタンパク質蛍光化の抑制が観察された．また，a*t*Ral 暴露により低下する ARPE-19 細胞の生存率が PM の添加によって有意に上昇することを WST アッセイによって明らかにした．さらに，ウェスタンブロット法によってアポトーシスシグナル因子を解析した結果, PM 処理が抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 のタンパク質レベルを増加させ, caspase-9 および PARP の活性化を抑制することが判明した．以上の結果から，PM は atRal によって惹起されるアポトーシスを抑制し，ARPE-19 細胞保護効果を発揮することが示唆された.

age-related macular degeneration, pyridoxamine, lipofuscin

講演番号：3B06p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟南 B06 会場

ローヤルゼリーが老齢マウスの腸内細菌叢に及ぼす影響
Effects of royal jelly on gut microbiota in aged-genetically heterogeneous mice.
○石川 朋美[1]、奥村 暢章[1]、戸田 年彦[2]、小澤 裕介[2]、清水 孝彦[2]、生田 智樹[1]、立藤 智基[1]([1]株式会社山田養蜂場本社、[2]千葉大院医 先進加齢医学)
○Tomomi ISHIKAWA[1], Nobuaki OKUMURA[1], Toshihiko TODA[2], Yusuke OZAWA[2], Takahiko SHIMIZU[2], Tomoki IKUTA[1], Tomoki TATEFUJI[1] ([1]Yamada Bee Company, Inc., [2]Chiba Univ.)

【目的】ローヤルゼリー（RJ）は古来より老化予防素材として期待されている。我々は昨年度の本大会で RJ が、ヒトと同様に遺伝的な多様性を持たせた 4 系統ヘテロマウスにおいて、老化に伴う運動機能低下を予防することを報告した。しかしながら RJ の健康寿命延伸効果に関連する要因についての研究は十分ではない。近年、腸内細菌叢を構成する菌のバランスが健康寿命に関係することが報告されている。そこで本研究では、加齢や RJ 投与による腸内細菌叢変化を解析することで、RJ の抗老化作用と腸内細菌叢との関連を明らかにしようとした。
【方法】4 系統ヘテロマウスは DBA/2CrSlc（♂）と C3H/HeSlc（♀）を交配させた交雑マウス C3D2F1（♂）に、CB6F1/slc（BALB/cCrSlc,♀×C57BL/6NCrSlc,♂）（♀)を交配させることにより得た。若齢（3 ヶ月齢）と老齢（32 ヵ月齢）の 4 系統ヘテロマウス(♂)に、終濃度 0.5 % (w/w)となるように RJ を含有させた混餌を 1 ヶ月間投与した。投与後に大腸便と盲腸便を採取し、QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて DNA を精製した後、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析を行った。
【結果と考察】各群の菌叢比較を行った結果、4 系統ヘテロマウスの大腸便と盲腸便は構成する菌がそれぞれ大きく異なり、加齢と RJ 投与で優勢菌種である Bacteroidetes 門と Firmicutes 門、Proteobacteria 門の割合に変化がみられた。主座標分析においても加齢に伴い大腸便、盲腸便ともに腸内細菌叢が大きく変動し、RJ 投与により異なった菌叢構成への変化がみられた。大腸便においては属レベルで 24 種類について加齢変化が認められ、RJ 投与による比較では老齢群で 5 種類、若齢群では 2 種類の菌に関して差がみられた。盲腸便においては属レベルで 19 種類について加齢変化が認められ、RJ 投与による比較では老齢群で 5 種類、若齢群では 1 種類の菌に関して差がみられた。これらのことから、RJ 投与における腸内細菌叢の変化は若齢群より老齢群においてより顕著に認められることが示唆された。現在 RJ 投与により変化した代謝物の解析を行っており、宿主への直接的な作用を含めた RJ の抗老化メカニズムを解明し、本発表で併せて報告したいと考えている。
【結論】本試験の結果から、遺伝的多様性モデルである 4 系統ヘテロマウスにおいて、RJ が腸内細菌叢変化を誘導することが明らかとなった。今後さらにヒト試験を行うことで、腸内細菌叢を介した RJ のヒトへの健康に与える影響についても明らかにしていきたい。

royal jelly, gut microbiota, aging

発表責任者：石川 朋美（ti1740@yamada-bee.com）

講演番号：3B07a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B07 会場

離乳直後のラットにおける短期間咀嚼が海馬に与える効果の評価

Short-term mastication after weaning effects on hippocampus in rat

○宮口 一勢[1]、永井 俊匡[2]、斉藤 芳和[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]高崎健大・栄養、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○ Hitonari MIYAGUCHI[1], Toshitada NAGAI[2], Yoshikazu SAITO[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】咀嚼はストレス解消、肥満抑制などの生理機能を持つことが知られている。また、近年問題となっている咀嚼頻度の低下は脳の活性化や空間記憶の低下を引き起こすことが報告されている。しかし、咀嚼に関する研究の多くは行動学および生化学的なもので、分子レベルでの研究は少ない。さらに、咀嚼が脳に与える影響についての研究の多くは成体で行われているため、発達期における咀嚼の脳への影響は未だ明らかにされていない部分が多い。そこで、本研究では咀嚼頻度の異なる粉末飼料あるいは固形飼料をラットに与え、DNA マイクロアレイによりラット脳内発現遺伝子を網羅的に解析し、発達期において咀嚼が脳に与える効果の一端を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】3 週齢の離乳直後の Wistar 系雄ラットに粉末または固形飼料を与え(各群 n= 5)、8 日間飼育した。飼育期間中の体重や摂食量において両群で有意差は見られなかった。飼育後に海馬を摘出、total RNA を抽出し、Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を用いて qFARMS 法により正規化後、Rank products 法を用いて 2 群間比較を行い、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを有意に発現変動した遺伝子(DEG)として抽出した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA)の Diseases and Functions を用いて、|z-score| > 2.0 かつ p-value < 0.05 の条件では 83 個の Term が抽出された。この中には、neuritogenesis development of neurons, differentiation of neurons, learning, cognition などの神経の新生・発達、空間記憶に関わる 9 つの Fuction が含まれていた。これら 9 つは、全て z-score > 2 であつた。よって、咀嚼による海馬の遺伝子発現変動は、神経の新生や発達、認知や学習機能に関わる機能を亢進することが示唆された。また、ウェブツール DAVID を用いた DEG の解析により、濃縮された Gene Ontology (GO)解析でも axonogenesis, dentate gyrus development などの神経の新生や発達に関わる Term が含まれていた。以上のことから、離乳直後の発達期に咀嚼頻度が高い固形餌を摂取し、より強度の高い感覚刺激が入力されることで、海馬の神経の新生や発達が促進されることが示唆された。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, hippocampus, DNA microarray

講演番号：3B07a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B07 会場

離乳直後の短期間咀嚼は視床の GABA シグナリングを亢進して樹状突起スパインを減少させる

Short-term mastication after weaning upregulates GABAergic signalling and reduces dendritic spine in thalamus

○永井 俊匡[1]、小川 真奈[2]、齋藤 芳和[2]、宮口 一勢[2]、阿部 啓子[2,3]、朝倉 富子[2] ([1]高崎健大・栄養、[2]東大院農生科・応生化、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Toshitada NAGAI[1], Mana OGAWA[2], Yoshikazu SAITO[2], Hitonari MIYAGUCHI[2], Keiko ABE[2,3], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [2]Univ. of Tokyo, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】咀嚼は脳機能を活性化させ、精神を健康に保つ働きがある。しかし、幼児期の神経発達に与える咀嚼の効果の分子メカニズムについては、あまり知られていない。そこで我々は、離乳直後に咀嚼頻度に差をつけたラットについて、脳内における遺伝子発現の変化を解明した。
【方法】3 週齢の Wistar 雄性ラットに粉末または固形飼料を与え、8 日間飼育した。視床 total RNA を抽出し、Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を用いて qFARMS 法により正規化し、階層的クラスタリング解析を行った。Rank products 法で 2 群間比較し、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを、有意に発現変動した遺伝子(DEG) として抽出した。DEGs は、ウェブツール DAVID による遺伝子オントロジー（GO）解析、および Ingenuity pathway analysis (IPA, Qiagen)で機能分類した。
脳冠状切片を slice Golgi Kit（Bioenno Lifesciences）を用いてゴルジコックス染色し、視床の後腹側核外側部（VPL）と後腹側核内側部（VPM）の樹状突起スパイン数を、第 1～第 4 分岐に分けて計測した。VPL と VPM の識別は、隣接切片のアセチルコリンエステラーゼ染色陰性の領域とした。
【結果・考察】階層的クラスタリング解析の結果、視床の遺伝子発現パターンは飼料によって変化することが明らかになった。GO 解析において、Chemical synaptic transmission と Positive regulation of dendritic spine morphogenesis の 2 つのタームが有意に濃縮された。Chemical synaptic transmission については、グルタミン酸脱炭酸酵素と GABA 受容体の遺伝子が、固形飼料群で発現上昇した。さらに小胞 GABA トランスポーター（VGAT）などの GABA シグナリング関連遺伝子も同様に発現上昇したことから、咀嚼が GABA シグナリングを活性化することが示唆された。Dendritic spine morphogenesis については、スパイン形成に関与する 9 つの遺伝子が、有意に発現変動した。また、IPA による解析から、Extension of neurites、Branching of neurites、Branching of neurons などの機能が、固形飼料群で抑制されることが予測された。実際に、VPL と VPM のスパイン数は固形飼料群で有意に減少した。これらの結果から、離乳直後の咀嚼は視床の GABA シグナリング遺伝子発現を亢進して、スパインの刈り込みを亢進することが示唆された。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, thalamus, DNA microarray

講演番号：3B07a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B07 会場

過去の味刺激に伴う味嗜好性変化に関与する脳領域の解析

Brain regions related to taste preference changes due to post experience of taste stimulation

○山口 雅裕、成川 真隆、三坂 巧（東大院農・農生科）
○Masahiro YAMAGUCHI, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】 食に対する好みには個人差がある。この個人差が生じる原因として、生理状態や環境、経験などの影響が示唆されているが、その詳細はよくわかっていない。我々は過去に何を食べたかという食経験に着目し、そのような経験に伴う味嗜好性変化とその発生要因を検討してきた。これまでに実験動物を用いた評価系において、以前に経験した強い味刺激がその後の嗜好性を変化させうること、さらに、その変化には口腔内の味検出系が関与しない可能性を見出した。口腔内で検出された味シグナルは中枢で情報処理されることから、食経験に伴う味嗜好性の変化には末梢ではなく中枢の味情報処理システムの関与が考えられた。本研究では食経験により味嗜好性が変化する分子機構を明らかにすることを目指し、食経験に伴う味嗜好性変化に関与する脳領域の同定を試みた。

【方法】 実験には C57BL/6J マウスを使用した。発達期のマウスに甘味刺激を経験させた甘味経験群と、水のみを提示したコントロール群の 2 群を設けた。これらマウスを一定期間飼育した後、甘味溶液(1 M Sucrose)を 90 分間摂取させ、その際の神経活動の程度を c-Fos 発現を指標とし評価した。甘味溶液摂取後、直ちに麻酔を投与し、PFA で還流固定を行った。摘出した脳から薄切切片を作製し、c-Fos 抗体を用いて抗体染色を行った。本研究では、報酬系を構成する扁桃体、側座核、腹側淡蒼球、腹側被蓋野、視床下部を解析の対象とした。各領域における c-Fos 陽性細胞数を計数し、コントロール群と甘味経験群で比較した。同時に、c-Fos の発現変化が味質特異的な応答かどうかを検討するために、両群に苦味刺激(3 mM Denatonium benzoate)を与えた際の c-Fos 発現に関しても解析した。

【結果】 甘味経験群ではコントロール群と比較して、甘味刺激により扁桃体および視床下部において c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が観察されたが、その他の領域で差は認められなかった。一方、苦味刺激を与えた場合では、扁桃体および視床下部における c-Fos 陽性細胞数は両群間で有意な差は認められなかった。このことから、食経験による嗜好性の変化には、これらの領域が関与する可能性が考えられた。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste, taste preference, c-fos

発表責任者：山口雅裕（myama1992@gmail.com）

講演番号：3B07a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B07 会場

老化促進モデルマウスを用いた加齢依存的な味嗜好性変化とその発生要因の検討

Considering the change in age-dependent taste preference and its occurrence factor in senescence-accelerated mouse

○上吉原 絢、成川 真隆、河江 真宏、幸田 理恵、三坂 巧（東大院農生科）
○Aya KAMIYOSHIHARA, Masataka NARUKAWA, Masahiro KAWAE, Rie KHOTA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景と目的】超高齢社会に突入した現代、高齢者の健康を維持することは社会的に大きな関心事である。年を取ると味覚は衰え、食は細くなる。そのため、味覚機能を維持することで健康的な食生活を送ることは重要な意味をもつ。しかし、味覚機能が加齢によりどのように変化するのか？また、なぜ変化するのか？といった詳細は明らかではない。老化促進系統である SAM マウスは早期成熟・早期老化を示す近交系マウスで、寿命が通常マウスの 2/3 程度と短命であることが知られている。これまで我々は、C57BL/6J（B6）マウスを用いて、加齢による味嗜好性の変化とその発生要因を検討してきた。B6 マウスの寿命は 2 年半程度であるが、十分に加齢するまでには長期間を要する。従って、実験期間の短縮は加齢研究を進めるうえで大きなメリットである。そこで本研究では SAM マウスを用いて加齢による味嗜好性の変化と、その変化の要因が口腔内の味覚機能へ関与している可能性を検討した。
【方法】若齢群として 8～19 週齢、高齢群として 69～80 週齢の雄性 SAMP1 マウスを使用した。味嗜好性は、5 秒間に味溶液をなめた回数から嗜好率を算出するリッキング法と、水と味溶液を 48 時間提示し、各々の飲水量の比率から嗜好性を算出する 48 時間二瓶選択法によって評価した。この時、基本五味を味溶液として使用した。また、味蕾中の味関連分子の発現はリアルタイム PCR および免疫染色法により解析した。さらに、味細胞の増殖速度を解析するためにブロモデオキシウリジン（BrdU）投与実験および味細胞の免疫染色による BrdU 計測を行った。
【結果】高齢群において、一部味質に対する嗜好性の変化が観察されたことから、SAMP1 系統においても加齢により味嗜好性が変化することを確認した。味蕾中の味関連分子の発現では、発現量が変化する分子が観察されたものの、その変化量はわずかであった。また、BrdU 計測による解析において、味細胞の増殖速度に加齢による影響は認められなかった。従って、加齢による味嗜好性変化に口腔内の味覚機能の変化は関与しない可能性が示された。味嗜好性の変化が観察された週齢は、B6 マウスでは 120 週齢以降であったが、SAMP1 マウスでは 69 週齢以降であった。SAMP1 マウスを使用することで、実験期間の短縮が期待できる。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

aging, senescence-accelerated mouse, taste preference

講演番号：3B07a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B07 会場

離乳期のマウス大脳皮質において食刺激依存的な発現変動を示す遺伝子の解析

Changes in expression patterns of marker genes in mouse cerebral cortex throughout the weaning period

○河江 真宏、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Masahiro KAWAE, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【背景・目的】子供の頃の食経験が、大人になってからの嗜好性に影響を及ぼすことが示唆されている。特に離乳期は、母乳から母乳以外の食事へと移行し、食環境が大きく変化する時期であるため、この時期に経験する新規の食刺激は、嗜好性形成に大きな影響を及ぼすと予想される。味や食感などの食情報は口腔内で受容された後、種々の神経を介して伝達され、最終的に大脳皮質味覚野・体性感覚野（以下、食関連領域とする）で処理される。食刺激が中枢神経の可塑性を変えることで、食に対する嗜好性が変化すると考えられるが、その詳細は明らかではない。我々は離乳期の食経験が脳の機能や構造に及ぼす影響を解析するために、これまでに食刺激依存的に発現変動する遺伝子の抽出を試みた。その結果、離乳期の固形食摂取により食関連領域において発現増加する遺伝子として 12 遺伝子を見出した。本研究では、それら分子の中から食刺激により生じる中枢の変化を検出し得るマーカー分子の特定を試みた。

【方法】実験には離乳期前後の C57BL/6J 雄性マウスを使用した。仔マウスを母獣と共に飼育し、19 日齢から 4 日間固形食を提示した実験群と母乳のみを摂取させたコントロール群に分けた。まず、固形食刺激の有無により生じる発現パターンの変化を *in situ* hybridization（ISH）により解析した。食刺激依存的に発現変動する遺伝子の中で、発現量の増加率が特に高かった 4 分子を対象とし、プローブを合成した。食関連領域を含む領域で切片を作製し、吻尾軸方向に染色を行った。
また、単一の味刺激の提示が食関連領域における遺伝子発現量に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法により解析した。実験群として、通常の固形食提示群と共に、無味餌提示群と高ショ糖食提示群を設け、前述の 12 遺伝子について比較した。

【結果】ISH を行った 4 分子の中に、固形食摂取により発現パターンが変化する傾向を示すものが含まれていた。したがって、この分子は食刺激により生じる変化を検出するためのマーカーとして有用であると期待される。現在、単一の味刺激が遺伝子発現量に及ぼす影響については解析を進めている。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste, gene expression, weaning period

講演番号：3B07a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B07 会場

Bifidobacterium breve A1によるアルツハイマー病モデルマウスの認知障害に対する対する改善作用
Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease

○小林 洋大[1]、嶋田 耕育[2]、密山 恵梨[1]、久原 徹哉[1]、安岡 顕人[2]、近藤 隆[2,3]、阿部 啓子[2,4]、清水 金忠[1] ([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、[2]地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所食品機能性評価グループ、[3]国立研究開発法人 理化学研究所　統合生命医科学研究センター、[4]東京大学大学院 農学生命科学研究科)
○Yodai Kobayashi[1], Kousuke Shimada[2], Eri Mitsuyama[1], Tetsuya Kuhara[1], Akihito Yasuoka[2], Takashi Kondo[2,3], Abe Keiko[2,4], Jin-zhong Xiao[1] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Next Generation Science Institute, [2]Group for Food Functionality Assessment, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [3]RIKEN-IMS Laboratory for Developmental Genetics, [4]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】
アルツハイマー病をはじめとした認知症は全世界的に増加しており、今後も爆発的に増加することが危惧されている。アルツハイマー病は発症すると症状を改善させることが困難であり、根本的な治療法がない現在では、発症予防や進行抑制を目的とした生活習慣への介入や、機能性食品による日常生活の中での対策が求められている。近年、腸内細菌叢による脳機能への影響が注目されており、脳と腸の機能連関を意味する「脳腸相関」が脚光を浴びている。ビフィズス菌は腸内細菌叢の主要構成菌であり、その生理作用は整腸作用を中心に広範囲にわたり報告されているが、ビフィズス菌を含むプロバイティクス摂取によって抗不安作用が報告されるなど、脳機能への好影響が期待されている。本研究では、乳児から取得した *Bifidobacterium breve* A1（以下 *B. breve* A1）にアルツハイマー病モデルマウスの認知機能を改善する可能性を見出したことを報告する。
【方法】
アルツハイマー病の原因物質と考えられているアミロイド β をマウスの脳内に投与し、アルツハイマー病のモデルとしたマウスに *B. breve* A1（1×10^9 cfu）を 10 日間にわたり経口投与し、Y 迷路試験と受動回避試験を用いて自発的交代行動率および反応潜時を評価した。さらに、*B. breve* A1 摂取による海馬での遺伝子発現への作用を検討するため、海馬の遺伝子発現を次世代シーケンサーによる RNA-seq によって網羅的に解析した。
【結果・考察】
ビフィズス菌投与群は、媒体対照群と比較して Y 迷路試験による自発行動交替率に有意な改善が認められた。また、受動回避試験による反応潜時においても、有意な改善が認められた。加熱死菌体の *B. breve* A1 やビフィズス菌の主要代謝産物である酢酸の摂取によっても一部認知機能改善の作用が観察されたが、生きた *B. breve* A1 が最も改善作用が強く、その効果は陽性対照として用いたドネペジルと同程度であり、*B. breve* A1 による認知障害への改善作用が認められた。また、RNA-seq による網羅的遺伝子解析では、モデルマウスの海馬にて誘起された過剰な免疫反応や脳内炎症が、*B. breve* A1 の摂取により抑制されることが認められた。以上の結果から、*B. breve* A1 はその抗炎症作用により Aβ の毒性を和らげ、アルツハイマー病の発症リスクを低下させる可能性が示唆された。

Alzheimer's disease, probiotics, Brain-gut microbiota axis

発表責任者：小林洋大（youd-kobayashi@morinagamilk.co.jp）

講演番号：3B07a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B07 会場

Bifidobacterium breve A1による軽度認知障害の方の認知機能に対する改善作用の可能性～単群前後比較試験～

Bifidobacterium breve A1 supplementation improved Cognitive Decline in Older Adults with Mild Cognitive Impairment: an open-label, single arm-study

○前畑 葉月[1]、小林 洋大[1]、木下 徹[2,3]、松本 彰男[4]、吉野 一弘[4]、斉藤 功[2]、清水 金忠[1] ([1]森永乳業株式会社研究本部、[2]愛媛大医、[3]ちいき進かがく株式会社、[4]あき整形外科リハビリテーションクリニック)

○ Hazuki MAEHATA[1], Yodai KOBAYASHI[1], Tetsu KINOSHITA[2,3], Akio MATSUMOTO[4], Kazuhiro YOSHINO[4], Isao SAITO[2], Jin-Zhong XIAO[1] ([1]Morinaga Milk Industry, [2]Ehime Univ., [3]Institute of Community Life Sciences Co., Ltd, [4]Aki Orthopedics Rehabilitation Clinic)

【目的】認知症の根本療法が確立されていない現状で、日常生活の中で継続できる認知症予防方法の開発は重要である。我々はアルツハイマー病モデル動物を用いて、*Bifidobacterium breve* A1（*B. breve* A1）がアルツハイマー病による認知機能の低下を抑える可能性を有することを明らかにした。そこで、*B. breve* A1 の継続摂取による認知症予防または改善効果の可能性を検証するため、整形外科に通院する地域高齢者を対象に、単群前後比較による予備調査を実施した。

【方法】愛媛県松山市内の整形外科に通院中で軽度認知障害（MCI）に該当する高齢者 27 名（Mini-Mental State Examination（MMSE）22～26 点、男性 2 名、女性 25 名、83.2±10.1 歳）を対象に、*B. breve* A1 を、1 日 200 億、24 週間摂取してもらった。開始時及び 8 週後、16 週後、24 週後に MMSE 及び Digit Symbol Substitution Test（DSST）による認知機能評価、Gastrointestinal Symptom Rating Scale（GSRS）による胃腸の状態の評価、Profile of Mood States（POMS 2）による気分状態の評価を実施した。

【結果】*B. breve* A1 の摂取により、MMSE スコアにおいては摂取前 24.4±1.4 点から、摂取 8 週後（25.4±2.6, P=0.03）、16 週後（25.8±2.9, P<0.01）、24 週後（26.1±3.0, P<0.01）といずれにおいても有意な上昇が認められた。特に、MMSE の下位尺度のうち「計算」スコアが有意に上昇した（P<0.01）。また、*B. breve* A1 を試験終了まで継続摂取した 19 名については、摂取前は全員が MCI に該当していたが、24 週後には MCI 該当者は 6 名に減少した。その他、胃腸の状態に関しては、「下痢」「便秘」症状の改善効果が示唆され（GSRS スコア（下痢）：摂取前 1.48±0.83、24 週摂取後 1.20±0.48、P<0.01）、気分状態においては POMS 2 の A-H（怒り-敵意）、T-A（緊張-不安）において改善の可能性が示唆された。なお、*B. breve* A1 の摂取による有害事象は見られなかった。

【結論】*B. breve* A1 の継続摂取による、MCI に該当する高齢者の認知機能改善効果が示唆された。今後は、プラセボ摂取群を対照とした二重盲検デザインにより、*B. breve* A1 の長期摂取による有効性を検証する必要がある。

Bifidobacterium, mild cognitive impairment, brain-gut microbiota

発表責任者：前畑　葉月（hazuki-maehata188@morinagamilk.co.jp）

講演番号：3B07a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B07 会場

Bifidobacterium breve A1による統合失調症の抑うつ不安症状に対する改善作用の可能性ならびにレスポンダーとノンレスポンダーの検討

Effect of *Bifidobacterium breve* A1 on anxiety and depressive symptoms in schizophrenia : A proof-of-concept study

○勝又 紀子[1]、大久保 亮[2]、小田巻 俊孝[1]、清水 金忠[1]、松岡 豊[2]([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、[2]国立研究開発法人国立がん研究センター 社会と健康研究センター 健康支援研究部)

○ Noriko KATSUMATA[1], Ryo OKUBO[2], Toshitaka ODAMAKI[1], Jin-zhong XIAO[1], Yutaka J.MATSUOKA[2] ([1]Next Generation Science Institute, R&D Division, Morinagamilk Industry Co.,LTD., [2]Division of Health Care Research, Center for Public Health Science, National Cancer Center Japan)

【目的】統合失調症は多くは青年期に発症し、幻聴や妄想を特徴とし、慢性に進行する精神疾患である。抑うつ症状は急性期、慢性期などの病期を問わず存在し、統合失調症の治療において、抑うつ不安は非常に重要な課題である。近年、腸内細菌叢による脳機能への影響、すなわち「脳腸相関」が注目され、腸内細菌叢の主要構成菌であるビフィズス菌を含むプロバイオティクス摂取による抗不安作用の報告等、脳機能への好影響が期待されている。今回、われわれが独自に乳児より取得し、アルツハイマー病モデルマウスの認知機能改善の可能性を見出した *Bifidobacterium breve* A1（以下 *B. breve* A1）による統合失調症患者の抑うつ不安症状の改善作用の可能性ならびに responders と nonresponders の検討結果について報告する。

【方法】北海道大学病院精神科外来加療中で、Brief Psychiatric Rating Scale（BPRS）の抑うつ不安項目の合計得点が 10 点以上の 20 歳以上の統合失調症患者を対象に、*B. breve* A1 を 4 週間、毎日 1,000 億摂取してもらった。抑うつ不安症状は、客観的には Positive and Negative Syndrome Scale（PANSS）、主観的には Hospital Anxiety and Depression Scale（HADS）にて評価した。摂取前、4 週間摂取後、摂取終了から 4 週間経過後に糞便を採取し、腸内菌叢の解析を行った。また、摂取前および摂取後に採血し、免疫パラメーターなどを評価した。4 週間後の HADS 総スコアにおいて、ベースラインより 25%以上の減少が認められた群を responders、 認められなかった群を nonresponders として、検討した。

【結果】30 名が参加し 29 名が試験を完遂した。HADS 総スコアと PANSS 抑うつ不安スコアは 4 週間で有意に改善した。Responders、nonresponders はそれぞれ 12 名、17 名であり、responders は nonresponders に比して、統合失調症における陰性症状が軽度であること、食習慣において乳製品の摂取量が少ないこと、腸内菌叢の属レベルでの占有率において Parabacteroides が有意に多いことが確認された。さらに、血中の IL-22 および TRANCE の発現においては、responders ではベースラインから 4 週間で有意に増加したが、nonresponders では増加が認められなかった。

【結論】本結果により、*B. breve* A1 の統合失調症にともなう抑うつ不安症状の改善作用の可能性が示唆された。今後さらに食事との関連性、免疫応答、腸内菌叢との関連を明らかにしていく予定である。

schizophrenia, probiotics, anxiety and depressive symptoms

発表責任者：勝又紀子（n_katumt@morinagamilk.co.jp）

講演番号：3B07a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B07 会場

空腹による味覚感受性変化を制御する外側視床下部神経の解析
Lateral hypothalamic glutamatergic neurons modulate hunger-induced change in taste sensitivities
○傅 欧[1]、岩井 優[1]、三坂 巧[1]、中島 健一朗[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]生理学研究所)
○Ou FU[1], Yuu IWAI[1], Takumi MISAKA[1], Kenichiro NAKAJIMA[1,2] ([1]The Univ of Tokyo, [2]NIPS)

味覚は、食物の価値の判断基準として機能している。味の感じ方は空腹や満腹など、生理状態によっても変化することが知られているが、どのような機構でその感受性が変化するかについては、依然として不明である。我々はこれまでに光遺伝学の手法を用い、視床下部の摂食亢進神経であるアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）を人為的に活性化すると、甘味・苦味に対する感受性が変化することを見出した。また、AgRP 神経の複数の投射先のうち、外側視床下部が最も味嗜好性に影響を及ぼすことも明らかになった。外側視床下部には、グルタミン酸作動性神経と GABA 作動性神経が存在することが知られている。本研究では、外側視床下部におけるグルタミン酸作動性神経が味覚嗜好性に与える影響について検証を行った。

アデノ随伴ウイルスを用い、外側視床下部に存在するグルタミン酸作動性神経を特異的に標識するとともに、AgRP 神経のマーカーである AgRP との二重染色を行った。その結果、外側視床下部の吻側側に存在するグルタミン酸作動性神経の一部が、AgRP の局在位置と重なることが観察されたため、この神経が AgRP 神経と接続していることが示唆された。

AgRP 神経が活性化すると、投射先の二次神経の活動を抑制することが知られている。そこで、次に抑制性 DREADD である hM4Di を吻側の外側視床下部グルタミン酸作動性神経に特異的に導入し、人工リガンドである CNO を腹腔注射した後のマウスにおける味覚感受性を、brief access test により評価した。その結果、この神経の活動が抑制されると、甘味溶液であるスクロースに対する感度が上昇する一方で、苦味溶液であるデナトニウムに対する感度が低下することが明らかになった。

以上の結果から、外側視床下部のグルタミン酸作動性神経が AgRP 神経の下流に位置し、空腹時の味覚感受性変化の制御に大きな影響を与えることが示唆された。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」、およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

taste, hunger, hypothalamus

講演番号：3B07a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B07 会場

栄養状態が橋結合腕傍核の味覚応答神経に与える影響の検証

Effects of nutritional status on activities of taste-responsive neurons in the parabrachial nucleus in mice

○岩井 優[1]、傅 欧[1]、三坂 巧[1]、中島 健一朗[1,2] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]生理学研究所)
○Yu IWAI[1], Ou FU[1], Takumi MISAKA[1], Kenichiro NAKAJIMA[1,2] ([1]Univ.of Tokyo, [2]NIPS)

［背景］ 味覚は甘・旨・苦・酸・塩の 5 つの基本味から構成され、脳内に伝達されることで食物の価値の判断基準として機能する。また、味の感じ方は常に一定ではなく、体内のエネルギー状態の違いによって変化することが経験的に知られている。しかし、空腹、満腹などの体内エネルギー状態が導く生理状態の変化と、味覚感受性変化との関わりについては、未だ明らかにされていない。

［目的］ 結合腕傍核（parabrachial nucleus, PBN）は後脳の橋に存在する神経核で、複数の亜核から構成される。その一部は、舌→味神経節→延髄孤束核（NTS）の順で伝わる味覚伝導路において、NTS の次の中継点として機能している。また過去の報告から、PBN に存在する味応答神経は、味覚情報と内臓・体性感覚を統合して伝達する可能性も示唆されている。そこで本研究では、PBN に存在する味応答神経に注目し、栄養状態に依存して味覚感受性変化が生じるメカニズムの一端の解明を試みた。

［方法］ マウスの PBN において、刺激依存的な神経活動マーカーである転写因子 c-fos の発現量が甘味・苦味刺激後に上昇するかを、免疫組織染色によって評価した。その後、空腹状態のマウスでも同様の実験を行い、通常時の結果と比較した。また、摂食を誘導する視床下部のアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）の活動の変化が PBN へどのように影響するかについても、検証を行った。

［結果・考察］ 通常時のマウスでは、甘味・苦味刺激によって、PBN の特定の部位で c-fos が発現上昇する様子が示された。一方、空腹状態のマウスでは、いずれの味刺激でも PBN の外側部における c-fos 陽性細胞数が通常時よりも減少することを見出した。また PBN における AgRP 神経の投射先が、味刺激によって c-fos が発現増加した領域と一部、重複することも明らかになった。したがって、空腹時に PBN の神経活動の低下が見られた原因の一つは、視床下部の AgRP 神経からの抑制性インプットであることが示唆された。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」、およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

taste, PBN(parabrachial nucleus), immunohistochemistry

講演番号：3B07a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B07 会場

ヒト甘味受容体安定発現細胞株の応答性向上の試み

Improvement of stable cell lines expressing the human sweet taste receptor

○竹谷 千晶、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Chiaki TAKETANI, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】Class C GPCR に属する T1R2 及び T1R3 は、ヘテロダイマーを形成し、甘味受容体として機能する。我々はこれまでに、一つのベクター中に 2 つの受容体サブユニットおよびキメラ G タンパク質をタンデムに組み込んだ発現プラスミドを構築し、それを培養細胞のゲノム中に 1 コピー導入するといった方法によってヒト甘味受容体安定発現細胞株の作出を行った。これにより、一過性発現細胞と比較して応答が顕著に大きく、簡便なヒト甘味アッセイ系の構築に成功した。（Imada, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 220-225, 2010）

ヒト甘味受容体の機能解析を目的に、多種の点変異導入受容体を安定発現する細胞株も作製してきたが、導入する変異によっては野生型受容体発現細胞よりも極端に応答が低下する例も散見した。本研究では、発現プラスミドのデザインを変更し、新たにヒト甘味受容体安定発現細胞株を複数種類作出した。それらを詳細に比較することでヒト甘味受容体安定発現細胞の改善、およびより良い応答取得のための条件を探索することを目的とした。

【方法】hT1R2 と hT1R3 について、二つの発現カセットをタンデムに並べるという既存の発現コンストラクトを改変するため、基本的なデザインは維持し、hT1R2 と hT1R3 の順序やプロモーターの種類を変更した。新たな改変発現プラスミドを導入した安定細胞株を、網羅的に 7 種類作出した。

それぞれの安定発現細胞に蛍光カルシウム指示薬を取り込ませた後にリガンドを投与し、リガンド濃度依存的な蛍光強度の増加を計測した。また、すべての細胞について、リアルタイム PCR を用いて hT1R2 と hT1R3 の mRNA 発現量を測定した。コンストラクトごとの応答性と受容体サブユニット mRNA 発現量を比較検討し、応答性向上に必要な条件を考察した。

【結果】プロモーターの変更により、既存のヒト甘味受容体安定発現細胞よりも応答性の高い新規細胞株の作出に成功した。リアルタイム PCR での測定から、発現プラスミド上で前方に組み込んだコード領域の mRNA 発現量が増加すること、さらに hT1R2 の mRNA 発現量が hT1R3 と比較して多い細胞株の応答性が高い傾向が認められるなど、いくつかの知見が明らかになった。

taste, receptor, stable cell line

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B07a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B07 会場

２種の III 型味細胞と味神経間の情報伝達機構の解明
Elucidation of transduction from two types of Type III taste cells to gustatory nerve fibers
○藤本 典大、清水 英憲、林 由佳子（京都大学大学院　農学研究科　農学専攻　品質評価学分野）
○Norihiro FUJIMOTO, Hidenori SHIMIZU, Yukako HAYASHI (Laboratory of Quality Analysis and Assessment, Grad. Sch. of Agric. Kyoto Univ.)

【背景と目的】味を受容する味蕾は、ⅠからⅣの味細胞から構成されている。これらの味細胞のうちⅡ型細胞が甘味・苦味・うま味を、Ⅲ型細胞が酸味を受容すると考えられている。味細胞で受容された味情報は味神経へと伝達されていくが、味神経と直接シナプスを形成しているのはⅢ型細胞のみであり、Ⅱ型細胞で受容された味情報が味神経に伝達されている機構はいまだわかっていない。現在、味刺激を受けたⅡ型細胞が情報伝達物質として ATP をⅢ型細胞に向けて放出し、Ⅲ型細胞が情報伝達物質としてセロトニンを味神経に放出することにより、味情報を伝達するという説が提唱されている。この説に基づくと、Ⅲ型味細胞は「味受容細胞としての酸味を受容する役割」と「Ⅱ型細胞から放出された ATP を受容する役割」を持つと考えられる。本研究室の先行研究により、Ⅲ型細胞はさらに機能分化をして、「酸味受容型Ⅲ型細胞」と「ATP 受容型Ⅲ型細胞」の 2 種類が存在することが確認されている。そこで、２種類存在すると明らかになったⅢ型細胞の両方ともが、現在考えられている味情報伝達機構を共通して利用しているのか否か、すなわち神経伝達物質としてセロトニンを有しているのかが新たな不明点として挙げられた。本研究では、機能面と受容体の発現の面から、セロトニンの発現を確認することで、Ⅲ型味細胞と味神経間の情報伝達機構の解明を目的としている。
【実験手法】初めに、機能面からの実証を目的として、カルシウムイメージング法を用いて味溶液に応答する細胞を選び出し、免疫細胞化学的に受容体とセロトニンの局在性を確認した。続いて、受容体の局在性の確認を目的として、マウス有郭乳頭の味蕾でのセロトニン分布を免疫組織染色で調べた。
【結果と考察】カルシウムイメージング法により、酸味に応答する細胞も ATP に応答する細胞のどちらもが、セロトニンを持つことが示された。これより２種類のⅢ型味細胞のどちらもがセロトニンで情報伝達をしていることが示唆された。一方、Ⅲ型細胞マーカーの NACM とセロトニンを用いた免疫組織染色法の結果から、Ⅲ型細胞の全てがセロトニンを有しているわけではないことが確認された。さらに、酸味受容型細胞マーカーの CAR-4 とセロトニンの共染色により、多くの酸味受容型Ⅲ型細胞がセロトニンを有していないことが確認された。これはカルシウムイメージング法の結果と異なる。一連の結果より、従来の２つのⅢ型細胞がセロトニンを介して情報伝達をする説に加え、酸味受容細胞が ATP 受容型Ⅲ型細胞に対して情報伝達を送り、ATP 受容型Ⅲ型細胞が味情報の統合をしているという説が新たに考えられた。

serotonin, Type III taste cell, sour taste

発表責任者：藤本　典大（fujimoto.norihiro.84x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B07a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B07 会場

味細胞の構成割合の変化が味覚神経の存在比に与える影響
Influence of change in ratio of TRC types to the number of innervating gustatory neurons
○成川 真隆[1]、前田 尚廣[1]、石丸 喜朗[1,2]、山本 くるみ[1]、阿部 啓子[1,3]、三坂 巧[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]明治大農・農化、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Masataka NARUKAWA[1], Naohiro MAEDA[1], Yoshiro ISHIMARU[1,2], Kurumi YAMAMOTO[1], Keiko ABE[1,3], Takumi MISAKA[1] ([1]The Univ. Tokyo, [2]Meiji Univ., [3]KISTEC)

［目　的］食べ物の味は味細胞で検出され、その情報は味覚神経に伝達される。味細胞は味覚神経との間に適切かつ厳密な神経連絡を形成することが知られているが、その詳細は明らかではない。我々はこれまでに転写調節因子 Skn-1a を欠損したマウスでは、甘・旨・苦味受容細胞が欠失し、酸味受容細胞が大幅に増加することを見出している。その味覚表現型として、甘・旨・苦味に対する味応答の消失が観察された。一方、酸味に対する Skn-1a 欠損マウスの味応答は野生型と変わらず、酸味細胞数が増加しているのにもかかわらず、酸味応答に変化は認められなかった。この理由として、酸味を伝達する味覚神経の数は一定であり、味蕾を構成する味細胞の割合が変化しても、味覚神経の存在比は変わらないためと仮説立てた。本研究ではこの仮説を検証するために、酸味細胞特異的に経シナプストレーサーを発現させたマウスを作出し、酸味細胞の数の増加が酸味を伝達する味覚神経細胞の存在比に影響を与えるかどうか検討した。
［方　法］経シナプストレーサーである小麦胚芽レクチン（WGA）を酸味受容体 *pkd1l3* プロモーター下に組み込み、トレーサータンパク質の存在によって酸味伝達神経を検出できる *pkd1l3*-WGA Tg マウスと、甘・旨・苦味受容細胞が酸味受容細胞に置き換わった表現型である Skn-1a$^{-/-}$マウスを使用した。両者を交配し、*pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{+/+}$と *pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{-/-}$マウスを作出した。これらマウスの有郭乳頭（CvP）と味覚神経節（NPG）における WGA 陽性細胞数を免疫染色法により計測した。NPG においては、味覚神経マーカーP2X$_2$ を発現する神経細胞を味覚神経と定義した。
［結　果］CvP における WGA 陽性細胞数は *pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{+/+}$マウスに比べ、*pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{-/-}$マウスではおよそ 3 倍に増加していた（15.4±10.2% vs. 46.5±13.1%）。しかし一方で、NPG の味覚神経における WGA 陽性細胞数は、*pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{+/+}$と *pkd1l3*-WGA/Skn-1a$^{-/-}$マウスで、それぞれ 19.3 ± 1.5%と 20.0 ± 5.9%と同程度であり、味細胞レベルで観察された WGA 陽性細胞数の大幅な増加は味覚神経節では観察されなかった。この結果は前述の仮説を支持し、味蕾を構成する味細胞の割合が変化しても、味覚神経の存在比には影響を与えないことを示唆する。したがって、Skn-1a 欠損マウスで酸味応答に変化が見られなかった理由として、酸味を伝達する味覚神経の存在比が変わらないことが考えられた。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

Sour taste, Taste receptor cells, Gustatory neuron

講演番号：3B07a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B07 会場

緑葉タンパク質由来の新規グレリン分泌抑制ペプチドの発見

The finding of green leaf-derived peptide to suppress ghrelin secretion

○徳山 雄基[1]、中戸 絢也[1]、倉林 篤史[2]、佐藤 大[2]、鈴木 秀幸[2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1]([1]京大院農食品生物、[2]かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部)
○Yuki TOKUYAMA[1], Junya NAKATO[1], Atsushi KURABAYASHI[2], Masaru SATO[2], Hideyuki SUZUKI[2], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Research & Development, Kazusa DNA Research Institutes)

【目的】グレリンは、摂食促進作用を示す消化管ペプチドホルモンであり、その分泌抑制物質は抗肥満作用が期待できる。最近、我々は食品（外因性）分子によるグレリン分泌に着目し、牛乳や大豆に由来するグレリン分泌調節ペプチド lacto-ghrestatin や soy-ghretropin を発見した[1-2]。さらに今回、緑葉由来の新規グレリン分泌抑制ペプチドを見出した。

地球上に存在する最も多いタンパク質は、光合成の二酸化炭素固定を触媒する RuBisCO であり、緑葉野菜や緑茶などに多量に存在する。本研究ではこの RuBisCO の酵素消化物から見出された抗不安様ペプチド RuBisCO Anxiolytic-Like Peptid（rALP）-2 がグレリン分泌抑制作用を示すことを発見した。さらに、化学合成した RuBisCO の部分ペプチドについて、消化管を想定した酵素条件で分解し、rALP-2 生成に寄与する酵素を検討した。

【結果および考察】グレリン分泌細胞 MGN3-1 に rALP-2（Tyr-His-Ile-Glu-Pro-Val）を添加したところ、培養液中のグレリン濃度が用量依存的に減少した。したがって、rALP-2 がグレリン分泌抑制作用を有することが判明した。rALP-2 は Forskolin 添加による cAMP 濃度の上昇を抑制した。しかし、細胞内 Ca2+濃度の上昇は認められなかった。したがって、rALP-2 のグレリン分泌抑制作用は G タンパク質共役受容体の Gi の活性化を介している可能性が示唆された。

また、RuBisCO の部分ペプチドを、消化管を想定して Pepsin、次に Pancreatin で消化したところ、効率的に rALP-2 が生成することが明らかとなった（24 mol%）。さらに、各酵素による検討によって、Pepsin および、Pancreatin 中に含まれる Elastase が、rALP-2 の生成に重要であることが明らかとなった。したがって、RuBisCO 摂取により消化管内で rALP-2 が生成しているものと考えられる。

【結論】緑葉由来の抗不安様ペプチド rALP-2 がグレリン分泌抑制作用を有することを新たに見出した。また、Rubisco の部分ペプチドを用いた検討により、消化管を想定した酵素消化条件で処理することにより rALP-2 が生成することが明らかとなった。

[1] Nakato, J. et al. FEBS Lett. 590, 2681–2689 (2016)
[2] Aoki, H. et al. FEBS Lett. 591, 2121–2130 (2017)

RuBisCO, Ghrelin, rALP-2

発表責任者：徳山雄基（qqku2vm9k@yahoo.co.jp）

講演番号：3B07a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B07 会場

Lactobacillus brevis SBC8803 株によるグレリン分泌促進作用および食欲増進作用
Lactobacillus brevis SBC8803 increases acyl ghrelin secretion and food intake
○齋藤 弘貴、中北 保一、土屋 陽一（サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所）
○ Hiroki SAITO, Yasukazu NAKAKITA, Yoichi TSUCHIYA (Frontier Laboratories for Value Creation, SAPPORO HOLDINGS LTD.)

【背景・目的】
食欲を適切に調節することは、生体内におけるエネルギー恒常性維持の観点から重要である。食欲ホルモン分泌制御を介して摂取エネルギーをコントロールすることによって、エネルギー恒常性を正常に保つことができる可能性がある。本研究では、胃から分泌される食欲促進ホルモンであるグレリンに着目し、*Lactobacillus brevis* SBC8803（SBL88 乳酸菌）のグレリン分泌促進作用を介した食欲増進の可能性について検証を行った。
【方法】
マウス胃初代培養系（*in vitro*）を用いて、培地中に分泌される活性型グレリン濃度を ELISA 法にて測定した。*in vivo* 試験としては、ラット鼠径部動脈にカテーテルを挿管し、SBL88 乳酸菌を胃ゾンデにて投与後 30, 60 分の血中活性型／不活性型グレリン濃度を測定した。更に、一晩絶食したラットに SBL88 乳酸菌を単回投与した後、30 分間の摂餌量を測定した。また、グレリン合成関連遺伝子発現量解析についても RT-PCR 法にて実施した。
【結果】
SBL88 乳酸菌をマウス胃初代培養細胞に添加したところ、30 分後における培地中の活性型グレリン濃度が上昇した。添加後 15, 30 分後の細胞内 mRNA 発現量解析の結果、合成関連遺伝子に差は認められなかった。動物実験において、SBL88 乳酸菌の単回投与後 30 分における血中活性型グレリン濃度が上昇し、活性型／不活性型グレリン濃度比も高値を示した。更に、SBL88 乳酸菌のラットへの単回投与により、投与後 30 分における摂餌量が増加した。
【結論】
SBL88 乳酸菌はグレリン産生細胞におけるグレリン分泌促進作用を介して血中活性型グレリン濃度を上昇させ、食欲を増加させる可能性が示唆された。

Lactobacillus brevis SBC8803, ghrelin, appetite

発表責任者：齋藤　弘貴（hiroki.saito@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：3B07p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B07 会場

新規霊長類消化管オルガノイド構築と機能解析
Generation and characterization of new intestinal organoids from primates
○熊木 竣佑[1]、稲葉 明彦[2]、木下 和弥[2]、齊藤 万佐子[2]、中村 倫果[2]、今井 啓雄[3]、粟飯原 永太郎[4]、山根 拓実[1,2]、大石 祐一[1,2]、岩槻 健[1,2]([1]東農大院農、[2]東農大応生、[3]京大霊長研ゲノム進化、[4]シンシナティ大医)
○ Shunsuke KUMAKI[1], Akihiko INABA[2], Kazuya KINOSHITA[2], Masako SAITO[2], Michika NAKAMURA[2], Hiroo IMAI[3], Eitaro AIHARA[4], Takumi YAMANE[1,2], Yuichi OISHI[1,2], Ken IWATSUKI[1,2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Kyoto Univ., [4]Univ. of Cincinnati)

【目的】消化管上皮には食事中の栄養素に応答してホルモンを分泌する内分泌細胞と、寄生虫感染時に 2 型自然免疫系を惹起する Tuft 細胞という二種類の味細胞様細胞が存在する。いずれも口腔内の味細胞が発現する味覚受容関連分子を発現し、齧歯類の消化管内腔におけるケモセンサーだと推測されている。しかしながら、味細胞様細胞は消化管上皮において 1%前後と少なく、リガンドや細胞内シグナル伝達物質などの知見は乏しい。ましてや、霊長類での味細胞様細胞に関わる研究は進んでいない。そこで我々は、味細胞様細胞に特異的な受容体および伝達物質を探索し、霊長類特有の味細胞様細胞機能の解明するために、霊長類の消化管オルガノイド作製と味細胞様細胞の解析系構築を目指した。
【方法】我々はまず、これまで作製例のない旧世界ザルの消化管からオルガノイドを作製し、霊長類の味細胞様細胞に関する新たな知見を得ようと試みた。旧世界ザルの十二指腸・空腸・回腸・盲腸・大腸それぞれを採取後、2% sorbitol,1% sucrose, 1% BSA, 2 mM EDTA / PBS において 15 分間インキュベートした。ピンセットを用いて上皮細胞層を剥離させ、セルストレイナーでクリプトを単離した。得られたクリプトの沈殿をマトリゲルに包埋し、Wnt3a, R-spondin, Noggin, hEGF, A-83-01, Nicotinamide 等を添加した培地を用いて培養した。この時、Dibenzazepine（DBZ：Notch シグナル阻害剤）や IL-4 といったサイトカインを用いた味細胞様細胞への分化誘導を試みた。味細胞様細胞の性質と機能解析には IHC(免疫組織化学染色)、RT-PCR、Ca アッセイ等を用いた。
【結果および考察】培養を開始して 6 時間後にはクリプトは球体構造を取り増殖を開始し、2 日後には、直径約 100 um の大きさに成長した。遺伝子・タンパクレベルでの DCLK1、CHGA（共に味細胞様細胞マーカー）の発現および Ca アッセイによる味物質への応答確認より、サル消化管オルガノイドは *in vivo* を反映していることが明らかとなった。また、DBZ により味細胞様細胞へ、IL-4 により Tuft 細胞へそれぞれ分化誘導できることを確認した。以上のことから、我々は世界に先駆けてサル消化管よりオルガノイド作製に成功したと判断した。最近になり、齧歯類と霊長類では味覚感受性に多くの差異があることが報告されているため、本霊長類オルガノイドはヒト研究への橋渡しとして最適なツールであると考えられる。今後、本培養系を用いたヒトの消化管ホルモン分泌や免疫系を制御する食品機能性成分の探索が進み、齧歯類中心の研究から脱却した“ヒトを対象とした新しい食の科学”へのパラダイムシフトが期待される。

Organoids, Primates, Taste like cells

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：3B07p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B07 会場

塩味を想起する香りと食経験

Salty flavor on the eating habits.

○河合 崇行[1]、日下部 裕子[1]、和田 有史[2] ([1]農研機構食品、[2]立命館大学理工)
○Takayuki KAWAI[1], Yuko KUSAKABE[1], Yuji WADA[2] ([1]NARO, [2]Ritsumei Univ.)

醤油中に含まれる香気成分が塩味増強を引き起こすことが知られている。その理由のひとつに、醤油の塩分と醤油の香りの連合学習が考えられる。我々は c57BL/6 マウスを用い、バニラ香やオレンジ香を塩味と対呈示経験をさせることにより、これらの香気成分添加により塩味増強効果が見られることを報告してきた。そこで、ヒトが塩味を想起しやすい食品由来の香気を用いて、バニラ香よりも強い塩味増強効果が得られるかを検討した。c57BL/6 を 4 群に分け、それぞれにバニラ、醤油、味噌、ベーコンから抽出した香料を添加した食塩水を呈示し、約 8 週間経験させた。利尿薬であるスピロノラクトンを混和した餌により飼育した塩味欲求性マウスを用いて、香料を添加した食塩水と添加していない食塩水に対するリック試験を行ったところ、いずれの群においても経験香料を添加した食塩水の方を有意に多くリックしていた。すべての香気に塩味増強効果があることを示している。効果の大きさを比較したところ、塩味を想起しやすいしにくいに関わらず、ほぼ同程度であった。このことは、塩味食品に特徴的な香り成分による塩味増強効果よりも、食経験や記憶による効果の方がメインであることを示唆している。

salt enhancement, flavor, eating habit

講演番号：3B07p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B07 会場

白ワインの酸味に影響する因子について

Influence factor of sour taste in white wine

○斉藤 史恵、下村 豪志、新海 有貴、久本 雅嗣、奥田 徹（山梨大・ワイン研）
○Fumie SAITO, Takeshi SHIMOMURA, Yuki SHINKAI, Masashi HISAMOTO, Tohru OKUDA (Yamanashi Univ.)

【目的】白ワインにおいて酸味は重要な評価項目の 1 つである。味蕾にある酸味受容体はプロトンが流入することによって応答することから、一般的に酸味は pH 低下依存的に惹起されると考えられている。一方で、酸味の指標に中和滴定で求められる滴定酸度が用いられる場合もある。酸味の指標に pH および滴定酸度の両方の説が存在しているが、酸味を強度や持続時間に細分化した場合、pH や滴定酸度が酸味のどの特性と関係しているのかは明確化になっていない。そこで本研究では、白ワインの酸味強度を経時的に測定し、pH および滴定酸度が強度および持続時間にどのように影響しているのか検討した。

【方法】白ワインの酸味の評価には、分析型官能評価である Time Intensity（TI）法を採用した。パネルは 13 名（男 9 名、女 4 名）で構成した。20 本の市販白ワインの pH と滴定酸度を測定し、値が異なる 8 本を選抜して官能評価に使用した。得られた TI 曲線より味の最大強度（Imax)、最大になるときの時間（Tmax）および強度が 0 になるまでの時間（Tend）などいくつかのパラメーターを抽出した。これらのパラメーターとワインの pH および滴定酸度の数値を用いて相関分析を行い、酸味に関与する因子を探索した。

【結果及び考察】試料ワインの pH は 2.9～3.3、滴定酸度は 5～8g/L の範囲であった。pH および滴定酸度の数値と TI 曲線から得られたパラメーターとを相関分析したところ、pH－Imax では負の相関、滴定酸度－Imax では正の相関がみられた。すなわち、pH が低いほどまた滴定酸度が高いほど酸味の最大強度が高くなることを示している。酸味強度が最大になるまでの時間 Tmax には pH と滴定酸度には相関性は見られなかった。ワインにおいて味の持続性は非常に重要な評価項目である。酸味の持続時間 Tend をみると、pH と酸味強度のいずれも相関性が見られなかった。これらの結果から、単純に酸味が強いワインが酸味の持続時間も長くなるわけではないことが明らかになった。そこで、酸味の持続時間を長くするワイン中の因子についてさらに検討することとした。

wine, sour taste, time intensity

講演番号：3B07p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B07 会場

口腔、消化管を介するエネルギー代謝調節の解析
Regulation of energy metabolism via oral and gastrointestinal tract
○萩本 政大[1]、成川 真隆[1]、中島 健一朗[2]、石丸 喜朗[3]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,4] ([1]東大院農生科・応生化、[2]生理学研究所、[3]明大農・農化、[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
○ Masahiro HAGIMOTO[1], Masataka NARUKAWA[1], Kenichiro NAKAJIMA[2], Yoshiro ISHIMARU[3], Tomiko ASAKURA[1], Keiko ABE[1,4] ([1]Univ. of Tokyo, [2]National Institute for Physiological Sciences, [3]Meiji Univ, [4]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】転写因子 Skn-1a は舌や腸などにおいて化学感受性を持つ細胞の分化に関わることが明らかになっている。当研究室ではこの Skn-1a の KO マウス(S-KO マウス)が舌において味細胞のうちⅡ型細胞が消失しており、甘味、旨味、苦味の受容が困難になっていること、小腸において化学感受性を持つとされる刷子細胞が欠損していることを確認している。また S-KO マウスは WT マウスと比較して体重が減少しており、その原因としてカテコールアミンの放出量増加に伴うエネルギー代謝の亢進が生じていることを明らかにしている。本研究では S-KO マウスを用い、脳でのエネルギー制御機構の解明を目指す。
【方法・結果】Skn-1a(-/-)マウス(n=18)と同腹仔の WT マウス(n=25)を用意し、HFD(High Fat Diet)で飼育した。16 週齢では、摂食量は遺伝子型に関わらず変化はないが、S-KO が低体重を示すことが確認された。その後 5 匹ずつ 26 週齢まで HFD での飼育を続けた後、視床と視床下部を合わせて摘出した。採取したサンプルから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。qfarms 法で正規化後 Rank Products 法で 2 群間比較をした後 false discovery rate(FDR)<0.05 を満たす発現変動遺伝子を抽出した。その結果、発現上昇している遺伝子 257 個、発現減少している遺伝子 297 個を得た。発現上昇している遺伝子の中に Fos(FBJ osteosarcoma oncogene)(FDR=0.0262)が含まれていたことから、S-KO マウスでは、視床・視床下部で活性化される部位が存在することが示唆された。また S-KO マウスはエネルギー消費量が WT マウスに比べて増加していることから、BAT において遺伝子発現変動が予測された。視床・視床下部と同様に BAT も DNA マイクロアレイ解析に供し FDR<0.01 を満たす発現変動遺伝子を抽出したところ、発現上昇している遺伝子 423 個、発現減少している遺伝子 547 個を得た。変動遺伝子を用いて Ingenuity Pathway Analysis(IPA)の pathway analysis を行ったところ、脂肪酸の β 酸化や脂肪細胞分化の亢進、免疫機能の低下が示唆された。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

energy metabolism, catecholamine, taste

講演番号：3B07p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B07 会場

GABA 摂取による疲労感・ストレスの経時的変化および睡眠の質改善効果

Time course of effect of GABA intake on fatigye, mental stress, and sleep

○中村 唱乃、耿 紅敏、山津 敦史、坂下 真耶、金 武祚（(株) ファーマフーズ)
○Utano Nakamura, Hongmin Geng, Atsushi Yamatsu, Maya Sakashita, Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【背景・目的】

γ-アミノ酪酸（以下、GABA と記載）はアミノ酸の一種で、生体内では抑制性の神経伝達物質である。これまでに我々はヒトにおいて GABA を摂取することでストレス緩和、疲労感軽減効果、および睡眠の質改善効果があることを報告してきた。これらの試験では GABA 摂取 30 分後に機能性を評価している。GABA は摂取 30 分後に血中濃度ピークを迎え、その後 1 時間後にも血中に GABA が残存していることが明らかとなっている。

そこで本試験では①GABA を朝に摂取した際、その日の疲労感やストレスおよび、翌日の疲労感やストレスが改善するか、②GABA を日中に摂取した際、夜間の睡眠の質が改善するか、2 つの試験を実施し、GABA 摂取による疲労感・ストレスの経時的変化および睡眠の質改善効果を検証することを目的とした。

【方法】

①健康な成人男女約 30 名を対象に試験を実施した。朝 9 時に活力（疲労感）やストレスなどの自覚症状に関するアンケートおよび唾液の採取をしたのちに、GABA 100 mg またはプラセボを摂取した。その後、3、6、9、12、24 時間後に同様のアンケートおよび唾液採取を実施した。唾液は回収後、精神的ストレスマーカーであるクロモグラニン A を測定した。当試験は、無作為化単盲検プラセボ対照クロスオーバー試験である。

②ピッツバーグ睡眠質問票のスコアが 5 点以上（睡眠に問題がある可能性がある）の健常な成人男女約 20 名を対象に試験を行う。昼間 15 時に GABA100 mg を 1 週間連続して摂取する。摂取前後には、就寝時に脳波計（SLEEPSCOPE）を装着し、睡眠時の脳波を測定する。翌朝、起床後すぐに起床時睡眠感調査票（OSA アンケート）を実施し、夕方に、VAS（Visual Analog Scale）アンケートを実施する。当試験は、無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験である。

【結果・考察】

①プラセボ群では夜にかけて疲労感やストレスを感じていたが、GABA 群では日中の体感を維持していることが明らかとなった。この結果より、GABA はその日 1 日の疲労感およびストレスを緩和し、活力をサポートすることができる食品として期待できる。

②については検証しており、当日併せて報告する。

gamma-aminobutyric acid, mental stress, fatigue

講演番号：3B07p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B07 会場

大豆ペプチドおよびカゼインペプチド経口摂取による脳内カテコールアミン代謝促進作用の比較解析

Comparison of the effect of soy peptide and casein peptide administration on catecholamine metabolism in the mouse brain

○日野 由佳子[1]、小柳 歩美[1]、市瀬 嵩志[3]、前渕 元宏[3]、古屋 茂樹[1,2] ([1]九州大農、[2]イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター、[3]不二製油株式会社)
○Yukako Hino[1], Ayumi Koyanagi[1], Takashi Ichinose[3], Motohiro Maebuchi[3], Shigeki Furuya[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Innovative Bio-Architecture Center, [3]FUJI OIL CO., Ltd.)

日本人は大豆製品摂取量が多く、このことが長寿や健康増進に関与していると言われている。また近年、分離大豆タンパク質を酵素処理して調製したジ-及びトリペプチドに富む大豆ペプチドは高吸収性や低抗原性に加え種々の生体調節作用を持ち、抗肥満効果や筋肉疲労軽減などを実証する知見が多く報告されている。さらに若年及び高齢者に対し脳機能改善作用を有するとのヒト試験報告もあり、機能性食品素材として注目されている。我々はこれまで、大豆ペプチドをマウスに高投与量（8.7g/kg体重）を経口摂取させることより脳内のチロシン含量が増加し、中枢神経伝達物質として機能するカテコールアミン類の一種であるノルアドレナリンの合成代謝が亢進されることを明らかにしている。しかしチロシンを大豆ペプチドと同程度含むカゼインペプチドも高投与量では同様の効果が見られたため、本研究では両ペプチドを低投与量条件で経口摂取させることによる両ペプチドの脳内アミノ酸・カテコールアミン代謝への影響を比較検討した。

C57BL/6N♂(9週齢)に大豆ペプチドまたはカゼインペプチドを胃ゾンデによって強制経口投与した（0.87g/kg体重)。ペプチド投与30分後に脳組織を取り出し、UPLCにてアミノ酸分析、HPLC-ECDにてモノアミン分析を行った。

大豆ペプチドまたはカゼインペプチドを経口摂取することで、血中の遊離チロシン量は対照群に比べ同程度約3倍に増加したが、大脳皮質の遊離チロシン含量は大豆ペプチド投与群がカゼインに対して有意に高かった。さらに神経活性の指標となる大脳皮質ノルアドレナリンの代謝回転も、大豆ペプチド投与群の方が高い傾向を示した。以上の結果より低濃度条件下において、大豆ペプチドはカゼインペプチドに比べて経口摂取後により強い脳内チロシン増加作用を有し、カテコールアミン合成代謝促進を介した脳機能改善効果が期待される。

brain function, food peptides, catecholamine

発表責任者：古屋　茂樹（shigekifur@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3B07p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B07 会場

胎児期からのビタミン E 欠乏がマウスの社会性認知能力に及ぼす影響
Effect of vitamin E deficiency from fetal stage on social recognition in mice
○渡邊 佑[1]、服部 達哉[2]、川口 真以子[2]、竹中 麻子[1] ([1]明治大農　農化、[2]明治大農　農)
○Tasuku WATANABE[1], Tatsuya HATTORI[2], Maiko KAWAGUCHI[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ. Agri. Agri. Chem., [2]Meiji Univ. Agri. Agri.)

【背景と目的】ビタミン E（VE）は抗酸化作用をもつ脂溶性ビタミンである。我々は、胎児期からの VE 欠乏食摂取によってマウスの不安様行動が増加することを報告した。本実験では胎児期からの VE 欠乏が、他者との関わり合いの指標である「社会性認知能力」におよぼす影響を検討した。
【方法】実験 1：胎児期からの欠乏の影響　妊娠 16 日目の C57BL6/J メスマウスを 2 群に分け、対照食（CON）あるいは VE 欠乏食（E-）を与えて離乳まで飼育した。オスの仔マウスを生後 24 日目に離乳し、母マウスと同じ実験食を与えて 5～6 匹／ケージで集団飼育し（CON: n=10、E-: n=11）、生後 10 週間からは個別飼育した。生後 11 週目に嗅覚馴化試験、12 週目に社会性認知試験を行い、社会性認知試験直後に断頭により血液及び脳を採取した。社会性認知試験では、あらかじめ 2 回提示した同系統の既知マウスと新奇マウスを被験マウスに同時に提示してそれぞれへの接触行動を解析した。嗅覚馴化試験は対象を匂い物質に代えて社会性認知試験と同様の手順で行った。母マウスを離乳日に、メスの仔マウスを生後 7 日目に解剖し、血漿と臓器サンプルを得た。
実験 2：離乳後のビタミンE再給餌の影響　妊娠 16 日目の C57BL6/J メスマウスに E-食を与えて離乳まで飼育した。オスの仔マウスを生後 30 日目に離乳し、CON 食または E-食を与えて 5～6 匹／ケージで集団飼育し（E-/CON: n=10、E-/E-: n=12）、生後 10 週間からは個別飼育した。実験 1 と同様に行動解析試験とサンプル採取を行った。
【結果と考察】実験 1 では離乳時の母マウスの血漿中、生後 7 日齢の仔マウス肝臓・胃内容物中の VE 濃度は E-群で有意に低かった。また、行動試験後の仔マウスの大脳皮質及び血漿中の VE 濃度は E-群および E-/E-群で CON 群、E-/CON 群と比較してそれぞれ有意に低かったが、大脳皮質の脂質過酸化マーカー(TBARS)濃度には差がなかった。実験 1 の行動試験の結果、CON 群では同時に提示された既知個体に比べて新奇個体に対する接触が有意に多かったが、E-群では有意な差がなく、胎児期からの VE 欠乏によって社会性認知能力が低下することが示された。一方で、嗅覚馴化試験ではどちらの群も新規匂い物質に対する接触が多い傾向を示し、嗅覚能力の異常は確認されなかった。実験 2 の行動試験の結果、E-/E-群でみられなかった新奇個体への接触増加が E-/CON 群では観察され、離乳後の VE 給餌によって胎児期からの VE 欠乏による社会性認知能力の低下が抑えられた。以上の結果から、胎児期から成長期までの連続したＶＥ欠乏食摂取によってマウスの社会性認知能力の低下が生じることが示された。

social recognition, vitamin E, social behavior

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3B07p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B07 会場

ビール苦味成分イソα酸の海馬ドーパミンを介した記憶学習機能改善作用
Memory improvement of iso-α-acids, bitter components in beer, via hippocampal dopamine
○阿野 泰久[1]、星 朱香[2]、内田 真一[3]、山田 浩司[3]、近藤 恵二[1] ([1]キリン(株)健康研、[2]キリン(株)基盤研、[3]協和発酵キリン(株)中枢神経研)
○Yasuhisa ANO[1], Ayaka HOSHI[2], Shinichi UCHIDA[3], Koji YAMADA[3], Keiji KONDO[1] ([1]Kirin Co. Ltd., Lab for Health Sci., [2]Kirin Co. Ltd., Central Lab. for Key Tech., [3]Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd. CNS Lab.)

【背景・目的】ビールの原料であるホップは古来より薬用植物として知られ、我々はこれまでホップ由来のビール苦味成分であるイソα酸が、脳内炎症の抑制により認知症予防効果を示すことを報告してきた(引用 1)。また、イソα酸摂取によるヒト脳活動改善の可能性が内閣府革新的研究開発推進プログラム ImPACT での実証トライアルによる MRI 測定によって示唆されている(引用 2)。本研究では、イソα酸が脳内炎症以外で認知機能、特に記憶学習機能に及ぼす影響を探索することを目的とした。
【実験方法】Aβオリゴマーの脳室内投与で認知機能を低下させた ICR マウス(雄性、6 週齢)にイソα酸(0.02-2 mg/kg)を経口投与し、投与 1 時間後に Y 字迷路試験および新奇物体認識試験を実施した。また、スコポラミンによる健忘惹起マウスを用いて同様の行動薬理試験を実施した。続いて、イソα酸投与の海馬での神経伝達物質放出への影響を評価するため、SD ラット(雄性、6 週齢)にイソα酸(0.5, 1 mg/kg)単回投与後の海馬で放出されたモノアミン量をマイクロダイアリシス法により測定した。更にドーパミンの関与を評価するため、マウスにイソα酸投与後にドーパミン D1 受容体阻害薬 SCH23390 を腹腔内投与し、Y 字迷路にて評価した。また、作用機序探索のため、マウスにイソα酸単回および 7 日間投与後の海馬のマイクロアレイ解析を実施した。
【結果】Y 字迷路試験および新奇物体認識試験の結果、Aβ脳室内投与およびスコポラミン健忘モデルのいずれでも、イソα酸の単回投与は濃度依存的に Y 字迷路での自発的交替行動率および新奇物体への探索時間を有意に増加した。また、イソα酸の主要な化合物であるシスおよびトランスイソフムロン等の単一成分で同様の作用を確認した。マイクロダイアリシスの結果、イソα酸の単回投与で海馬からのドーパミン放出量が有意に増加した。また、DR1 阻害薬の投与によりイソα酸の記憶改善作用が消失したことより、イソα酸はドーパミン放出を促すことで記憶力を改善することが示唆された。更にマイクロアレイ解析の結果、イソα酸投与により海馬におけるドーパミン産生、神経新生、神経可塑性に関わる遺伝子群の発現上昇が確認され、これらのシグナル経路の増強を確認した。
【結論】イソα酸の短期的な摂取は海馬におけるドーパミン放出を促し、記憶学習機能を増強することを明らかにした。イソα酸は風味付けや保存性向上の目的でビール醸造に長く利用されてきたが、我々の研究により、脳機能に対する生理作用が次第に明らかとなってきた。今後、イソα酸がドーパミン産生を促す機序や記憶学習機能への苦味受容体の関与など、より詳細な解析が待たれる。
引用１ Ano et al, J. Biol. Chem., 2017、引用２ 内閣府 ImPACT 2016 年 3 月 1 日リリース

dopamine, memory, hippocampus

発表責任者：阿野泰久（Yasuhisa_Ano@kirin.co.jp）

講演番号：3B07p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟南 B07 会場

紅茶ポリフェノール成分テアフラビンによる抗不安作用
The anxiolytic effect of the components of black tea polyphenols, theaflavin
○喜多 真弘[1]、内田 真一[2]、谷口 慈将[3]、山田 浩司[2]、阿野 泰久[1] ([1]キリン株式会社健康技術研究所、[2]協和発酵キリン株式会社中枢神経研究所、[3]キリン株式会社基盤技術研究所)
○Masahiro Kita[1], Shinichi Uchida[2], Yoshimasa Taniguchi[3], Koji Yamada[2], Yasuhisa Ano[1] ([1]Research Laboratories for Health Science & Food Technologies, Research & Development Division, Kirin Company, Limited., [2]Central Nervous System Research Laboratories, Central Nervous System R&D Unit, R&D Division, Kyowa Hakko Kirin CO., Ltd., [3]Central Laboratories for Key Technologies, Research & Development Division, Kirin Company, Limited.)

【背景・目的】近年、気分障害などの精神機能障害は年々増加しており、身体的のみならず精神的な健康維持は社会的・経済的にも大きな課題となっている。これまで紅茶や緑茶などの茶系飲料摂取が精神疾患のリスク低減につながるとの疫学的な報告がされており、緑茶中のテアニンやカテキンに抗不安・抗うつ作用が多く報告されている。一方で、緑茶と同様に世界的に消費される紅茶成分については、そのような研究報告が少ない。そこで本研究では、紅茶の代表的なポリフェノール成分であるテアフラビンについて、抗不安作用に対する作用を検証し、その作用機序を探索した。
【実験方法】テアフラビン TF40（焼津水産）を逆相系分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供し、テアフラビン類 90%以上となるように精製した凍結乾燥物を試験に供した。ddy マウス(雄性、5 週齢)に 1 mg または 5 mg/kg のテアフラビンを 10 日間経口投与した。投与 5 日目に高架式十字迷路、6 日目に明暗箱試験を実施し、オープンアームおよび明室の滞在時間を自動解析装置(SMART3.0、バイオリサーチセンター社)で解析した。また、投与 10 日目に前頭皮質を摘出し、モノアミンおよびその代謝物を HPLC-ECD によって定量した。
【結果】高架式十字迷路による評価の結果、5 mg/kg のテアフラビン投与群でオープンアーム滞在時間が対照群と比較して有意に増加した。また、明暗箱試験においても同様に 5 mg/kg のテアフラビン投与群で明室滞在時間の増加傾向が認められ、テアフラビン経口投与による抗不安作用を確認した。また、前頭皮質におけるモノアミンおよび代謝物を定量した結果、5 mg/kg のテアフラビン投与群でドーパミン（DA）の代謝産物である、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸（DOPAC）の量が対照群に対して有意に増加しており、ドーパミン放出の生化学的指標である DOPAC / DA 比も有意に増加していた。一方で、ドーパミン量に変動は認められなかった。また、ノルエピネフリンおよびセロトニンとそれらの代謝物量に関して変動は認められなかった。
【結論】マウスを用いた高架式十字迷路や明暗箱試験により、紅茶由来ポリフェノールであるテアフラビンが抗不安作用を示すことが示された。前頭前野におけるドーパミン放出量の増加がストレス抵抗性に寄与するとの報告がなされていることから（引用文献 1)、テアフラビンが前頭皮質のドーパミンの代謝に作用し、抗不安作用を示すと考えられる。紅茶由来のテアフラビンの摂取は抗不安作用・ストレス緩和作用を示すことが期待される。
引用文献 1 Shinohara R., et al., Mol. Psychiatry, 2017

black tea polyphenols, theaflavin, anxiety

発表責任者：喜多真弘（Masahiro_Kita@kirin.co.jp）

講演番号：3B07p10
講演日時：3 月 17 日 15:49～ 共通講義棟南 B07 会場

アンセリンのアルツハイマー病モデルマウスにおける記憶機能改善作用

Improvement of memory in Alzheimer model mice by anserine

○榎本 皓太、金子 順、塩谷 秋子、久恒 辰博（東大新領域）
○Kota Enomoto, Jun Kaneko, Akiko Enya, Tatuhiro Hisatsune (Tokyo Univ.)

【序論】近年、高齢化に伴い認知症患者の増加が社会的な問題となっている。当研究室の高齢者参加型の介入試験において、食品成分であるイミダゾールジペプチド（アンセリン ： カルノシン= 3：1)を 3 ヶ月摂取した群で、認知機能の低下が抑制されることが示された。また、変異型 APP, Presenilin1 が導入されたアルツハイマーモデルマウスは、18 ヶ月齢では認知機能が低下していることが明らかにされている。先行研究において、モリス水迷路試験を用いたアンセリンの機能評価において記憶機能改善作用が示唆されている。本研究では、このアルツハイマーモデルマウスを用い、アンセリン投与による認知機能低下を抑制する効果、及びその抑制機構を明らかにする事を目的とした。

【方法】18ヶ月齢以上のアルツハイマーモデルマウスを使用し、2ヶ月間 0.2 %アンセリン（鮭より抽出、東海物産製)溶液を自由摂取させた。またコントロールとしてアルツハイマーモデルマウスと野生型マウスに通常の水のみを自由摂取させた。記憶機能の評価として Novel Object Location(NOL)を用いた。NOL は試験前にハンドリングを 3 日間、1 匹五分ずつ行った。試験 1 日目、マウスを 2 つのオブジェクトを配置したオープンフィールドに放ち、探索行動を行わせた。翌日、オブジェクトの一方の位置を変え、探索行動の変化から記憶機能の評価を行った。行動試験後、灌流固定を行い、脳切片を作成した。炎症マーカーである GFAP、Iba1 抗体を用い免疫染色し、脳内の炎症度を評価した。さらに PDGFR 抗体を用いて脳血管表面のペリサイトの被覆率を測定した。

【結果】NOL の結果、通常の水のみを与えたコントロール群と比較し、アンセリンを投与したアンセリン群において、空間記憶機能の低下が有意に抑制されていることが示された。免疫染色の結果、コントロール群と比べ、アンセリン群は脳内の炎症反応が抑制される傾向が見られた。さらに、血管表面のペリサイトの被覆率を測定したところ、アルツハイマーモデルマウスにアンセリンを投与した群では被覆率が有意に上昇する結果が得られた。

【考察】アルツハイマーモデルマウスにおいて、イミダゾールジペプチドであるアンセリンの投与による認知記憶機能障害を抑制する効果が確認された。さらに、脳内の炎症が認知機能に影響する事が示唆されており、このアンセリンの投与は、脳内における炎症の抑制を介して脳機能の低下を抑制している事を示唆していると考えられる。また、今回見られたペリサイトの被覆率の変化から、血液中への Aβ排出作用の向上が考えられる。

Alzheimer's Disease, Anserine, Memory function

講演番号：3B08a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B08 会場

小麦粉生地物性とグルテニンマクロポリマーについて
Relationship between wheat dough properties and Glutenin Macro Polymer

○野崎 聡美（（株）日清製粉グループ本社)
○Satomi NOZAKI (Nisshin Seifun Group Inc.)

小麦粉は、世界の多くの国々で様々な形に調理・加工され、主食として食されている。用途に応じて多様な小麦粉が販売されているが、製パンにはタンパク質の量が多く、粘弾性のバランスの良いグルテンを形成する小麦粉が適している。そして、製パン性の劣る小麦粉には、酵素などを加えることでパン生地の加工性やパンの品質を大幅に改善できることが知られており、それらの添加剤は製パン改良剤と呼ばれる。しかし、製パン性に関与する小麦粉の成分や、製パン改良剤の作用メカニズムについては解明されていない部分が多い。我々は、この未解明部分を明らかにするための分析指標として、GMP (Glutenin Macro Polymer)に着目した。GMP とは、小麦粉やパン生地中からアルカリによって抽出されるゲル状の凝集体であり、多糖類とタンパク質から成る複合体である。その物性や量・構成成分などが小麦粉の品質と関係があることが近年報告されている。

我々は、製パン性の異なる 2 種類の小麦粉、すなわち春小麦主体、および冬小麦主体の小麦粉について、GMP の挙動を調べた。一般に、春小麦は冬小麦よりも製パン性に優れると言われている。これらの小麦粉から直捏法によりパン生地を調製し、工程中の 3 箇所（ミキシング後、一次発酵後、ホイロ後）にて採取した生地から GMP を抽出した。GMP の抽出量、粒子形状、および GMP を構成する糖の鎖長は、製パン工程において一定の規則性をもって変化し、春小麦と冬小麦の間には差異があることを確認した。特に、ホイロ後における GMP 量と糖鎖長に大きな違いが見られ、生地物性（伸展性および生地強度）の違いと照合することで、GMP の分析値とパンの加工適性を関連付けた。

更に、製パン改良剤の一例として、酵素製剤（ヘミセルラーゼ）を冬小麦主体の小麦粉に添加した場合の GMP と生地物性の変化を調べた。ヘミセルラーゼ添加により冬小麦の GMP の性状が、春小麦に近づくことを確認でき、GMP を指標に酵素製剤の製パン改良効果を評価できる可能性があることを明らかにした。

本講演では、GMP の性状と生地物性についての研究結果を分析例とともに紹介する。

glutenin macro polymer, wheat, dough properties

発表責任者：野崎　聡美（nozaki.satomi@nisshin.com）

講演番号：3B08a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B08 会場

組換え大腸菌による小麦ＬＯＸの生産とそのグルテニン構成変化機構の解明

Production of recombinant Lipoxygenase and their effects on glutenin components

○白石 玲[1]、浅水 一久[1]、菅原 紘貴[3]、佐藤 甫之[1]、今村 未央[2]、夏目 亮[2]、椎葉 究[1]、谷川 翼[2]
([1]東京電機大学大学院理工学研究科、[2]東京電機大学大学院工学研究科、[3]東京電機大学理工学部)
○Akira Shiraishi[1], Kazuhisa Asamizu[1], Kouki Sugawara[3], Motoyuki Satou[1], Mio Imamura[2], Ryo Natume[2], Kiwamu Shiiba[1], Tsubasa Tanikawa[2] ([1]Toukyo denki Univ. LSE, [2]Toukyo denki Univ., [3]Toukyo denki Univ. DLSE)

【目的】

リポキシゲナーゼ(LOXと以下略)は、小麦中に含まれる酸化酵素で少なくとも3種のアイソザイムがあり(1)、ドウを作製時に添加し酸化を促進することで製パン性を改良することが報告されている(2)。LOXは、二次加工中、グルテンの構造の変化を引き起こすことが報告されているが、その詳細な分子レベルでのメカニズム解明はされていない。グルテニンは、高分子量・低分子量グルテニンサブユニット（HMW-GS・LMW-GS）に分かれ、それぞれ構成するタンパク質の機能や構造が異なっている。当研究室では小麦LOXⅡ（アイソザイム２）の大腸菌組換えDNAによる大量発現に成功したため、これらを用いてグルテニンサブユニットを構成するタンパク質の構成変化に対する特性を分析し、製パン性への影響について研究を行った。

【方法】

大腸菌内での発現に適化したLOXⅡ遺伝子配列をコードするDNAを合成した。その遺伝子をPCRで増幅し、リコンビナーゼ反応を利用してpET-16bに組込んだ。配列を確認後、大腸菌BL21(DE3)を形質変換し組換えLOXⅡを発現させた（rLOXと以下略）。小麦粉にrLOXを添加し水を加えミキシングし、生地を凍結乾燥し、粉砕し、小麦粉試料の作製を行った。対照区としてrLOX無添加区も同様にして調製した。オズボーン分画法で、可溶性・不溶性グルテニンの沈殿物を抽出後、グルテニンサブユニットに分画し、構成タンパク質成分をSDS-PAGEにより比較した。さらに遊離SH基の測定を行い、各試料のSH基の変化を比較した。

【結果】

① 組換え大腸菌の１回の培養により、タンパク質0.98mg、LOX活性41.4munitsのサンプルが得られた

②不溶性グルテニンは、HMW-GS の比率が増加、LMW-GS の減少、遊離 SH 基の測定結果では、SS/SH は、不溶性グルテニンが、減少する等といった傾向が得られた事から、LOX の添加は、不溶性グルテニンの LMW-GS の SS を減らし、HMW-GS の SS を特異的に増やす作用があるのではないかと考えられた。

(1) K.SHIIBA *et. al*, 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ, Cereal Chem. 68(2):115-122
(2) K.SHIIBA et. al, 1993.Changes in solubility of wheat glutenin during Fermentation, Food Science and Technology Research.40(10):727-731

Lipoxygenase, glutenin

講演番号：3B08a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B08 会場

水溶性小麦グリアジンの陽イオン交換樹脂による脱アミド化

Deamidation of water-soluble wheat gliadin by cation-exchange resins

○中村 華恵[1]、落合 澄香[1]、阿部 竜典[1]、山口 勇将[1]、赤尾 真[1]、熊谷 仁[2]、裏出 令子[3]、熊谷 日登美[1] ([1]日大・生資科、[2]共立女子・家政、[3]京大・農)
○ Hanae NAKAMURA[1], Sumika OCHIAI[1], Ryusuke ABE[1], Yusuke YAMAGUCHI[1], Makoto AKAO[1], Hitoshi KUMAGAI[2], Reiko URADE[3], Hitomi KUMAGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kyoritsu Women's Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】脱アミド化反応は食品タンパク質の水溶性やゲル化性、乳化性などの機能を向上させる上で重要な反応である。我々はカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いることで、ペプチド結合の加水分解を起こさずに食品タンパク質を脱アミド化する方法を開発してきた。本法により脱アミド化された小麦グリアジンは、その水溶性や消化性が向上し、低アレルゲン化することを見出している。しかしながら、60%エタノールで抽出したグリアジンを用いたにも関わらず、グリアジンの本溶媒に対する溶解度が低く、また、60%エタノール中で陽イオン交換樹脂により脱アミド化した場合の脱アミド化率は 28%であった。近年、裏出らは、食塩を含有する小麦粉ドウから、純水に高濃度で溶解するグリアジンの抽出法（純水抽出法）を見出した[1)]。グリアジンは水中においてはエタノール中とは異なるコンフォメーションをとると考えられることから、純水に溶解したグリアジンを用いれば、陽イオン樹脂による脱アミド化が効率よく行えると期待できる。そこで本研究では、純水抽出法により調製したグリアジンを用い、陽イオン交換樹脂による脱アミド化を試み、その条件の最適化の検討を行った。
【方法】小麦グリアジンは、裏出らが開発した純水抽出法を一部改変して調製した。グリアジンの脱アミド化はバッチ法により行い、陽イオン交換樹脂量、グリアジン溶液濃度等を変化させ、最適条件の検討を行った。陽イオン交換樹脂は、予め HCl、水、NaOH で繰り返し洗浄し、最終洗浄を NaOH で行い、Na 型とした。脱アミド化処理は、純水に溶解した小麦グリアジンと樹脂とを混合後、室温で撹拌して行った。処理後、樹脂をろ別除去し、ろ液を凍結乾燥し、脱アミド化小麦グリアジンとした。脱アミド化率は、未処理グリアジン、樹脂で脱アミド化したグリアジン、塩酸で完全に脱アミド化したグリアジン中の窒素量を全窒素全炭素測定装置を用いて測定し、樹脂処理で除去された窒素量の未処理グリアジン中のアスパラギンとグルタミンに含有される窒素量に対する割合から算出した。
【結果】純水に溶解した小麦グリアジンも、60%エタノールに溶解したグリアジンと同様に、陽イオン交換樹脂と混合することにより脱アミド化された。脱アミド化率は、樹脂量 1.0 g/mL−0.1% protein sol.まで樹脂量の増加に伴って増加し、60%エタノール中で反応させた場合よりも高くなり、約 50%となった。また、樹脂量を固定し、グリアジン溶液の濃度を変化させた場合には、グリアジン溶液の濃度の増加に従って、脱アミド化率は減少する傾向が見られた。
【参考文献】1) Urade, *et al*., *J. Agric. Food Chem*., **56**, 1122−1130 (2008)

Deamidation, Wheat gliadin, Cation-exchange resins

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B08a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B08 会場

グリアジンのナノ凝集体構造に対する塩の作用
Effects of salt on nanostructures of gliadin aggregates
○東野 ゆうき[1]、佐藤 信浩[2]、杉山 正明[2]、清水 祥[1]、大原 英之[1]、裏出 令子[1] ([1]京大院農、[2]京大原子炉)
○ Yuki HIGASHINO[1], Nobuhiro SATO[2], Masaaki SUGIYAMA[2], Syo SHIMIZU[1], Hideyuki OHARA[1], Reiko URADE[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto-University, [2]Research Reactor Institute, Kyoto-University)

【背景と目的】パンやうどんなどの小麦粉生地の加工において塩化ナトリウム(NaCl)は、抗張力や伸展性を増強させ粘着性の低下をもたらすなどグルテンの物性調節に重要な役割を果たしている。水和グルテンタンパク質の動的粘弾性などの物性解析から、NaCl のグルテン物性への効果は小麦粉の主要タンパク質であるグリアジンへの作用が非常に重要であることが明らかとなっている。グルテン中ではグリアジンはグルテニンネットワークの隙間を埋めるフィーラーとして存在し、生地に粘性と伸展性を付与する。これまでに、抽出したグリアジンの濃厚な水和物を生地中のグリアジンのモデルとして解析し、その物性が NaCl により劇的に変化することを明らかにしてきた。また、X 線小角散乱解析により、水和物中でグリアジン分子はコアとなるナノスケールの一次凝集体を形成し、それらがさらに大きなスケールの階層的な凝集体構造を形成することをみいだすとともに、NaCl はそれら凝集体間の相関距離を短縮させることを明らかにしてきた。NaCl の効果は Na^+イオンあるいは Cl^-イオンのグリアジンと水分子との相互作用の結果であると考えられるため、本研究では NaCl 以外の塩の作用を解析することで、イオンの特性とグリアジン水和物の物性およびナノスケール構造との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】グリアジンは、先行研究で開発した純水抽出法で調製した。グリアジン水和物は 40 wt%になるように純水あるいは様々な塩溶液に懸濁し、解析に用いた。SAXS プロファイルは高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory の BL-6A で測定した。純水で水和したグリアジンの散乱プロファイルには、一次凝集体の存在を示す q = 0.3-0.4 nm^{-1}にピークがあるショルダーが存在する。NaCl の添加により①ピークの広角側へのシフト、②ピーク高の低下、③小角領域での新たなピークの出現がみられ、これらはそれぞれ「一次凝集体間の距離の短縮」、「密度ゆらぎの消失」、「二次凝集体の存在」を示唆している。KCl の散乱プロファイルへの影響は NaCl とほとんど同じであった。一方、他の塩化物 (KCl, LiCl, NH_4Cl, $MgCl_2$, $CaCl_2$)は 0.5M では、NaCl や KCl と同様の①および②の散乱プロファイルへの影響がみられたが、２M では①と②の影響が NaCl に比して緩やかになった。これらの塩化物では 0.5M でも③の変化が NaCl よりも低く、以上の結果からタンパク質凝集体への収斂作用が NaCl よりも低いことが示唆された。ナトリウム塩では、NaBr と NaI は①②③のすべての影響が NaCl よりも緩やかであった。一方、CH_3COONa はすべてのプロファイルの変化が NaCl よりも強かった。このような塩のグリアジン凝集体構造への影響と物性への影響との関係について、論じる。

gliadin, saxs, wheat

講演番号：3B08a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B08 会場

グリアジン分子種がグリアジンの性質および小麦粉生地特性に与える効果
Effect of molecular species of gliadin on properties of gliadin and dough characteristics
○浜川 旺久[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○Akihisa HAMAKAWA[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric, [2]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric, [3]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric)

【目的】
小麦粉生地物性および加工特性に対するグリアジンの影響について検討を行ったところ、グリアジン分子種のうちグリアジンの表面疎水性度が低く、ω-グリアジンの量比が高いほど、生地の伸展性が増大すること、また麺では茹で伸びが小さいことを報告した[1)]。本報告では、グリアジンからω、α/β、γ-グリアジンを分画し、それぞれの分子種が持つ性状を解析すると共に、グリアジンが小麦粉生地形成に与える効果について検討を行った。
【方法】
外国産小麦粉の 1CW からエタノールにてグリアジンを抽出し、さらにω、α/βおよびγ-グリアジンの 3 つの分子種に分画し、噴霧乾燥にて粉末を得た。グリアジンは SDS-PAGE および RP-HPLC にてそれぞれの組成を確認した。ANS 法にて表面疎水性度を測定し、疎水性相互作用を評価した。粒子径は、動的光散乱測定機（Dyna Pro NanoStar）にて測定した。また、各分子種をグルテン粉末（ADM 社製）および小麦粉に添加しそれぞれ生地を調製後、生地の粘性をテンシプレッサー（TAKETOMO 社製）にて、生地の伸展性を圧縮型物性測定機（Instron 社製)の引っ張り試験にて測定した。
【結果】
分画したグリアジン各分子種の組成を RP-HPLC にて確認した結果、ω画分はω比率 90.1%、α/β画分はα/β比率 83.5%、γ画分はγ比率 70.2%を示し、それぞれが主成分となる 3 分子種のグリアジン画分を得られたことが確認された。それぞれのグリアジンの表面疎水性度は、ω画分が 21.4±3.6、α/β画分が 102.3±3.7、γ画分 が 147.2±7.7 を示した。平均粒子半径はそれぞれ 79.4nm、110.0nm および 266.7nm を示し、表面疎水性度が高い分子種ほど粒子径が大きくなり疎水性相互作用が強まることが示唆された。また、各グリアジン画分をグルテン粉末および小麦粉に添加して調製した生地の粘性および伸展性は、何れもω画分が最も大きく、次いでα/β画分、γ画分の順であった。

1)日本食品科学工学会第 64 回大会 3Aa5

omega-gliadin, dough quality, hydrophobic interaction

講演番号：3B08a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B08 会場

カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ-ラクトグロブリンの機能改変

Functional improvements in β-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl cellulose

○米田 真以子、菅村 茉莉佳、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○ Maiko YONEDA, Marika SUGAMURA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】

β-ラクトグロブリン(BLG)は、牛乳中に含まれる主要な乳清タンパク質である。BLG は必須アミノ酸を多く含み，乳化性，気泡性，ゲル化性などの機能特性を有する，有用な食品タンパク質である。一方で，酸性条件下および塩存在下では乳化性が低下し，牛乳の主要なアレルゲンでもあるため，食品利用が制限される。本研究では，架橋剤を用いて BLG のアミノ基と食品に利用可能なカルボキシメチルセルロース (CMC) のカルボキシメチル基を結合させて複合体化することにより，BLG の機能特性の向上を行うこと，ならびに低アレルゲン化を達成することを目的とした。

【方法】

BLG のアミノ基と CMC のカルボキシメチル基のモル比が 1 : 5 になるように，BLG 200 mg および CMC 188 mg を蒸留水 200 mL に溶解した。この混合物を 0.1 M HCl を用いて pH4.75 に調整後，架橋剤である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) 333 mg を 30 分かけて加えた。3 h 攪拌後，2 M 酢酸緩衝液を 2 mL 加えて反応を停止した。透析後凍結乾燥に供することにより，BLG-CMC 複合体を調製した。複合体化の確認は SDS-PAGE により行い，サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分子量の測定を行った。カラムは TSK-gel G3000PW$_{XL}$ を用いた。また，レチノール結合能測定および自然蛍光測定法を行い，複合体の構造変化について評価を行った。複合体の乳化性は濁度法を用いて，乳化活性と乳化安定性を評価した。さらに，複合体を BALB/c マウスに免疫し抗血清を得た後，非競合 ELISA により BLG 特異抗体量の測定を行い，免疫原性を評価した。

【結果】

架橋剤を用いた複合体化により，BLG-CMC 複合体が得られた。SEC により BLG-CMC 複合体の分子量は約 200 kDa であることが明らかとなった。BLG と比較して BLG-CMC 複合体のレチノール結合能が 24.9 % に低下していたことから，レチノール結合部位の構造が変化したことが考えられた。また自然蛍光強度の低下から，複合体においては BLG 表面を CMC が覆う構造となっていると考えられた。BLG-CMC 複合体の乳化性は BLG と比較して pH5，pH7 で向上し，特に塩存在下では BLG-CMC 複合体は乳化安定性に優れていた。BALB/c マウスを用いた免疫原性試験により，BLG-CMC 複合体が BLG に対して免疫原性が低下したことが明らかとなった。本研究の手法は BLG の機能改変に有用であると考えられた。

β-lactoglobulin, protein conjugation, functional improvements

講演番号：3B08a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B08 会場

ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変
Functional Improvements in ß-lactoglobulin by Conjugation with Pectin
○影山 廉、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Ren KAGEYAMA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】
主要な乳清タンパク質である β-ラクトグロブリン（BLG）は，乳化性，気泡性，ゲル化性といった機能特性を有し，栄養学的にも優れているために，食品素材として有用なタンパク質である。しかし，多くの食品の pH である酸性条件下で乳化性が低下することや，牛乳中の主要なアレルゲンであることから，その利用は制限されている。本研究では，水溶性食物繊維である低メトキシペクチン（LMP）と BLG を，架橋剤である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド（EDC）を用いて複合体化することにより，酸性条件下での BLG の乳化性の改善とアレルゲン性の低減化を達成することを目的とした。
【方法】
BLG のアミノ基と LMP のカルボキシル基のモル比が 1:5 となるように，BLG 100 mg と LMP 150 mg を 0.9 % NaCl 溶液 100 mL に溶解し，pH を 4.5 に調整した後，LMP のカルボキシル基の 2 倍量の EDC（175 mg）を加え，室温で 3 時間反応させた。透析により過剰の EDC を取り除き，塩析により未反応の LMP の大部分を除去した後，Sephacryl S-100 HR を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応の BLG を除くことで複合体を精製した。複合体化の確認は SDS-PAGE により行い，BCA 法とフェノール硫酸法によりタンパク質含量と糖含量を測定した。続いて，精製した複合体を用いて免疫原性の評価を行った。ネイティブの BLG と精製した複合体のそれぞれを，フロイントのアジュバントを用いて BALB/c マウスに投与し，得られた血清中の抗体量を非競合法 ELISA により測定することで複合体の免疫原性について評価した。
【結果】
EDC を用いた架橋反応により，高分子量の複合体が生成されたことが SDS-PAGE の結果から確認できた。BLG と LMP のモル比は 4:5 であった。非競合法 ELISA の結果から，複合体で免疫したマウスの血清中の抗 BLG 抗体量の低下が認められた。また，複合体化により新たなエピトープが出現したことも確認されたが，その吸光度の値が小さいことから，血清中の特異的抗体量は全体として減少していると考えられ，糖との複合体化により免疫原性の低減化を達成できたと考えられた。今後乳化性を評価し，その結果についても併せて報告する。

β-lactoglobulin, protein conjugation, reduced immunogenicity

講演番号：3B08a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B08 会場

甘酒中のレジスタントプロテインに関する研究

Research on resistant protein in Amazake

長江 達樹[1]、中田 彩愛[1]、○川合 史晃[2]、見屋井 大輔[2]、中村 雅彦[2]、尾関 健二[1]([1]金沢工大バイオ・化学、[2]厚生産業（株））
Tatsuki NAGAE[1], Sae NAKATA[1], ○Fumiaki KAWAI[2], Daisuke MIYAI[2], Masahiko NAKAMURA[2], Kenji OZEKI[1] ([1]Kanazawa Institute Tecnolgy, [2]Kohsei industrial Co., Ltd.)

【背景および目的】米貯蔵タンパク質のプロテインボディⅠを構成するプロラミン画分は、ヒトの消化酵素で分解を受けず、難消化性タンパク質であるレジスタントプロテイン（RP）として、米タンパク質の 10-15%程度含有している。甘酒の製法は米麹と米、米麹と酒粕、米麹だけなどがあり、市販の甘酒は各種の製法で製造されている。以前の甘酒は嗜好性が強く、冬場の嗜好性飲料として販売されていたが、最近は季語にもあるように夏場の疲労回復など、特にアクティブシニア向けの栄養補給剤として多品種、年中販売され注目されている。甘酒の機能性としては、肥満抑制、腸内改善効果など報告されている。酒粕再発酵物の RP はサプリメントとして開発され、特にコレステロール低減、便通改善効果が高いと報告されている。これに対して甘酒にも経験的に同様な効果の報告もあり、RP が関与している可能性と効果を発揮するような量が含まれる可能性を推測している。そこで市販甘酒にどの程度の RP が含有され、その含有量は製造法の違いよるものなのか、また米麹と米由来の RP で分解性の違いがあるか、更には RP の含有量を高める方法について検討を行った。
【方法および結果】市販甘酒は十分に分散後、遠心分離（8,000 rpm, 15 分間）を行い、上清と沈殿に分画した。上清はタンパク質定量と SDS-PAGE を行った。沈殿は 2%SDS と 8 M 尿素を含む緩衝液（pH 6.8）で、10 分間のホモジナイザー（6,000 rpm）で分散し、その後 60℃で 2 時間タンパク質を抽出し、タンパク質定量と SDS-PAGE を行った。RP 量は SDS-PAGE により、市販サプリメントの 13 kDa のプロラミン量の検量線から算出した。11 種類の甘酒の遠心分離上清には RP はほとんど検出されず、全ての沈殿に RP を検出した。製造法では米麹と米、米麹と酒粕、酒粕、米麹の甘酒の順に RP の含量が少なくなり、原料米からのプロラミンが甘酒製造時に麹由来のプロテアーゼの分解を受けやすいことが推察できる結果となった。ヒトでコレステロール低減効果や便通改善効果を発揮する RP の有効量は約 113 mg/日と想定されており、米麹と米のみから製造されている甘酒 5 点中の 2 点は、100ml 中でその有効量と同程度またはそれを超える量に達していることが分かった。これにより甘酒コップ 1 杯（約 150ml）には、ヒトで機能性を発揮できる RP 量が含まれていることが推測された。また原料米と米麹中の RP を測定し、甘酒製造時の RP の残存方法についても検討を行った。

Amazake, Resistant protein, Rice koji

発表責任者：尾関　健二（ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3B08a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B08 会場

クロマグロ（*Thunnus orientalis*）皮コラーゲンの抽出と特性解析
Isolation and characterization of acid soluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen
○田中 照佳[1,2]、髙橋 賢次[1]、平田 舞花[1]、山本 恵子[1]、ビッシャシュ アマル[3]、森山 達哉[1]、河村 幸雄[1,4] ([1]近畿大院・応生化、[2]福島県立医大、[3]近畿大・水産研、[4]京都女子大)
○Teruyoshi TANAKA[1,2], Kenji TAKAHASHI[1], Maika HIRATA[1], Keiko YAMAMOTO[1], Amal Biswas[3], Tatsuya MORIYAMA[1], Yukio KAWAMURA[1,4] ([1]Kindai Univ., [2]Fukushima Med Univ., [3]Kindai Univ., [4]Kyoto Women's Univ.)

【目的】コラーゲンは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨を構成する主要タンパク質で、多細胞動物の細胞外基質の主成分でもある。その特異構造とアミノ酸組成およびアミノ酸の特性から、新規な生理機能を持つことが推測される。我々は、魚類未利用部位の有効利用法を見出す目的で、クロマグロ（*Thunnus orientalis*）皮粉砕物およびマグロコラーゲン加水分解物を CCl_4 誘導性肝障害モデルマウスに経口摂取させた。その結果、クロマグロ皮粉砕物およびマグロコラーゲン加水分解物の摂取は肝機能を保護することを明らかにした（Tanaka et al. 2012）。一方、ヒト子宮頸ガン細胞（Hela）およびヒト肝臓ガン細胞（HepG2）を 96 穴プレートに播種し、プレートに接着後クロマグロ皮コラーゲンサンプルを添加し、24 から 48 時間培養するとガン細胞の増殖が 30-70%抑制された（Han et al. 2011）。ガン細胞の増殖抑制効果は他の魚コラーゲンには認められなかったことから、その作用がクロマグロ皮コラーゲン特異的で、クロマグロ皮コラーゲンは他の魚コラーゲンにない独特の構造を持つことが示唆された。抽出したクロマグロ皮コラーゲンの性質を知ることは、クロマグロコラーゲンを機能性食品として利用するうえで重要である。そこで、本研究では抽出したクロマグロ皮コラーゲンの特性解析を行い、市販仔ウシⅠ型コラーゲンやサーモンⅠ型コラーゲンの性質と比較した。
【方法】24-32 日齢のクロマグロは近畿大学水産研究所浦神実験場にて得た。クロロホルム/メタノール（3:2）でクロマグロ皮を脱脂後、0.5 M 酢酸により酸溶解性コラーゲンを抽出した。抽出したクロマグロ皮コラーゲンを用いて、SDS-PAGE、リシルエンドペプチダーゼによるペプチドマッピング、アミノ酸組成の分析を行った。抽出コラーゲンの変性温度の測定には旋光計を用いた。また、サーモンⅠ型コラーゲン抗体を用いた直接 ELISA （Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）、サンドイッチ ELISA および阻害 ELISA を構築し、サーモンコラーゲン抗体との交差反応性を検討した。
【結果】抽出したクロマグロ皮コラーゲンはⅠ型コラーゲンで、α 鎖（α1 および α2 鎖）と β 鎖から構成されていた。アミノ酸分析の結果、クロマグロ皮コラーゲンはプロリンやヒドロキシプロリンが豊富に存在することがわかったが、その変性温度は他の魚コラーゲンと比較して低かった。ペプチドマッピングでは、クロマグロ皮コラーゲンの一次構造は仔ウシⅠ型コラーゲンやサーモンⅠ型コラーゲンとほとんど同じであることが示されたが、サーモンⅠ型コラーゲン抗体のエピトープ認識は他のコラーゲンと異なっていた。したがって、コラーゲンの一次構造は動物種間で高く保存されているが、エピトープ構造を含む部分配列はコラーゲンによって異なることが示唆された。

bluefin tuna, collagen, epitope

発表責任者：田中照佳（t-tanaka@fmu.ac.jp）

講演番号：3B08a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B08 会場

鶏の胚における卵白タンパク質 OVAX の局在

Localization of egg white protein OVAX in chicken embryo

○赤澤 隆志[1]、野々村 直樹[2]、佐藤 加奈恵[2]、小川 雅廣[2]、早川 茂[2] ([1]愛媛大院農、[2]香川大農)
○ Takashi AKAZAWA[1], Naoki NONOMURA[2], Kanae SATO[2], Masahiro OGAWA[2], Shigeru HAYAKAWA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ.)

【目的】

鶏卵白に、オボアルブミン(OVA)のアミノ酸配列と 61%の相同性を持つタンパク質 ovalbumin-related protein X(OVAX)が存在する。OVAX の生理機能は不明であるが、OVAX はヘパリンと強く結合することから、ヘパリンを介した生理機能が予測される。我々は有精卵の胚発生中に、OVAX のヘパリン結合力が経時的に弱まっていくことを 2016 年度大会で報告した。ヘパリンは胚発生中に起きる細胞増殖因子のシグナルを安定化している。そのため、OVAX のヘパリン結合力の低下は、発生中の細胞の挙動に何らかの関与をすることが推測されるが、ヘパリンが存在する胚組織中に OVAX が卵白から取り込まれているかは明らかとなっていない。そこで本研究では、発生卵中の OVAX の局在を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】

有精卵の卵を 37ºC(湿度 65%)で貯蔵し、貯蔵 10 日目の卵から卵黄、羊水、胚を取り出した。卵黄、羊水からタンパク質を抽出し、OVAX の存在を OVAX 抗体を用いたウエスタンブロッティング(WB)で調べた。卵黄タンパク質の WB の結果、貯蔵 0 日目の卵からは OVAX が検出されなかったのに対し、貯蔵 10 日目の卵から OVAX のバンドが検出された。また、羊水からも、OVAX のバンドが検出された。胚から 5 μm の切片を作製し、OVAX 抗体を用いて免疫組織染色し、光学顕微鏡で観察した。その結果、胚組織全体が発色したことから、OVAX は胚に取り込まれていることが示された。特に肝臓が強く発色したため、肝臓から抽出したタンパク質の WB を行った。その結果 OVAX のバンド(50 kDa)より 2 kDa 小さい 48 kDa のバンドが検出された。

【考察】

貯蔵 10 日目の有精卵から分取した卵黄と羊水から OVAX が検出されたことから、OVAX は胚発生中に卵黄、羊水に移行することが示された。OVA の胚への移行経路は、卵黄から胚の血液循環システムに入る経路と、羊水に移行し消化管システムから吸収される経路が考えられている [1]。免疫組織染色によって OVAX が胚組織から検出されたことから、OVAX も OVA と同様に、これら 2 つの経路で胚に移行していることが考えられる。OVAX は胚組織全体から検出されたことから、OVAX は胚発生において複数の機能を持っていることが示唆された。

1: 渡辺乾二. (2008). 食卵の科学と機能: 発展的利用とその課題. アイ・ケイコーポレーション.

ovalbumin-related protein x, ovalbumin, heparin

発表責任者：赤澤隆志（6742001k@stu.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3B08a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B08 会場

ヨーグルトカードにおける熱変性度の異なる WPI の添加効果とκ-カゼイン脱離との関係

Relationship of kappa-casein desorption and addition of WPI differing in heat denaturation degree on the yogurt card

○岡 大貴[1]、野口 智弘[1]、玉置 祥二郎[2]、内田 俊昭[2]、髙野 克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ、[2]雪印メグミルク(株)、[3]東京農大応生・化学）
○Daiki OKA[1], Tomohiro NOGUCHI[1], Shojiro TAMAKI[2], Toshiaki UCHIDA[2], Katsumi TAKANO[3]
([1]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Megmilk Snowbrand Co., Ltd, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

ヨーグルトのカード強度は、原料である脱脂乳の加熱処理の程度によって差異が生じる。我々は、加熱によってカゼインミセルのκ-カゼイン（κ-CN）がホエータンパク質のβ-ラクトグロブリン（β-Lg）と SS 結合にて複合体を形成し、κ-CN がカゼインミセルから脱離することで、ミセル表面の負電荷が減少し、ミセル間の反発力の低下と疎水性相互作用の増加によって、強固なカードが形成されることを明らかにした[1)]。また、原料乳にホエータンパク質を加え加熱処理することで、添加濃度依存的にκ-CN の脱離量が増加しカード強度が上昇することを報告した[2)]。本報告では、添加するホエータンパク質の熱変性度とカード強度およびκ-CN 脱離量との関係性について検討を行った。

【方法】

生乳から脂肪分を除去した非加熱脱脂乳に対し、80℃にて 0、3、6、9、12 分間処理し熱変性度を変化させたホエータンパク質分離物（WPI）を 1.0% 添加した後、80℃、30 分間処理し WPI 添加加熱乳を調製した。その後、glucono-δ-lactone を 1.84%（w/v）添加し、形成したカードの破断時の荷重（mN）をカード強度とした。また、WPI 添加加熱乳を超遠心分離（33,000g, 20℃, 65 分）に供し、その上澄液を RP-HPLC に供しκ-CN の定量を行った。

【結果】

無添加の加熱脱脂乳から調製したカードの破断強度（mN）は 110 を示したのに対し、熱変性度（WPNI）を変化させた WPI（10.29、10.27、7.39、3.61、2.47、0.92）を添加した加熱脱脂乳はそれぞれ 246.8、249.4、203.4、140.5 および 149.5 を示し、無添加よりも有意に高い値を示したが、変性度が高い WPI ほど低下することが示唆された。また、無添加の加熱脱脂乳では上澄液中にκ-CN の 25.7%が検出されたのに対し、WPI 添加加熱乳の場合、それぞれ 42.9、41.4、39.1、31.8 および 30.6%を示し、κ-CN の脱離量とカード強度との関係性がみられた。

1） 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集, 2B03p20
2） 日本食品保蔵科学科第 65 回大会講演要旨集, p87

beta-lactoglobulin, acid coagulation, milk gel

発表責任者：岡　大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

講演番号：3B08a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B08 会場

ループ領域がソーマチンの甘味、熱安定性に与える影響
Effects of loop regions in thaumatin on elicitation of sweetness as well as heat stability.
○光本 麻佑子、三上 文三、谷 史人、桝田 哲哉（京大院農）
○Mayuko MITSUMOTO, Bunzo MIKAMI, Fumito TANI, Tetsuya MASUDA (Kyoto Univ.)

【目的】甘味タンパク質ソーマチンは、ショ糖に比べモル比で 10 万倍と非常に強い甘味を呈する。これまでソーマチン部位特異的変異体を用いた解析より、クレフト面に存在する複数の塩基性アミノ酸残基、中でも 67 位のリジン残基（K67）、82 位のアルギニン残基（R82）が甘味発現に重要な役割をすることが明らかとなっている（１）。また N 末端側から数えて 2 番目のループ（K19～G27）上に位置する 21 位のアスパラギン酸（D21）をアスパラギンに置換すると、ソーマチンの甘味度が増加することから（２）、ループ領域への変異導入が甘味発現に寄与する可能性が示唆されている。
　またソーマチンは中性、アルカリ性条件下では、加熱後、急速に甘味を消失することから（３）、食品タンパク質としてより汎用的に利用する上で、耐熱性を付与させることも重要である。
　そこで本研究は、K67 近傍に存在する 5 番目のループ（Y57 ～ I65）に着目し、この部位への変異導入が甘味発現に与える影響および熱安定性に与える影響について明らかにすることを目的とした。
【方法】5 番目のループ上に位置する Y57、D59、D60、I65 についてリジンあるいはアルギニンに置換した変異体の作製を試みた。各種変異体は酵母 *Pichia pastoris* で発現させた。培養上清を透析後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、純度は SDS-PAGE および Native-PAGE で確認した。甘味閾値は三点識別法を用いたヒト官能検査により評価した。結晶化は蒸気拡散法にて行い、回折データの収集は大型放射光施設 SPring-8 にて行った。リコンビナントソーマチンの構造を用いて分子置換を行い、初期モデルを構築後、*Coot* によりモデル修正を、*PHENIX* により精密化を行い、構造を決定した。加熱変性温度は示差走査型蛍光定量法（DSF）により測定した。
【結果】Y57K、Y57R 両変異体とも甘味閾値についてはリコンビナントソーマチンと比べて有意な差は見られなかった。変性温度については、リコンビナントソーマチンと Y57R 変異体がそれぞれ 61.0℃、61.4℃であったが、Y57K 変異体の変性温度は 62.6℃であり、熱安定性が増大していた。X 線結晶構造解析の結果、Y57K 変異体では、変異導入した 57 位のリジン残基側鎖が新たに水分子と水素結合を形成していたことから、安定性が増加したのではないかと考えられた。現在、D59、D60、I65 変異体について検討を行っている。

（１）Ohta, K. *et al*., (2008) *FEBS J*., **275**, 3644−3652.
（２）Masuda, T., *et al*., (2016) *Sci. Rep*., **6**, 20225.
（３）Kaneko, R. and Kitabatake, N. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **65**, 409−413.

heat stability, sweetness, X-ray crystallography

発表責任者：光本麻佑子（mitsumoto.mayuko.76z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B08a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B08 会場

X 線小角散乱による大豆タンパク質の凝固過程の追跡
Coagulation process of soy proteins as revealed by small-angle X-ray scattering
○佐藤 信浩[1]、東野 ゆうき[2]、守島 健[1]、井上 倫太郎[1]、杉山 正明[1]、裏出 令子[2] ([1]京大原子炉、[2]京大院農)
○Nobuhiro Sato[1], Yuki Higashino[2], Ken Morishima[1], Rintaro Inoue[1], Masaaki Sugiyama[1], Reiko Urade[2] ([1]Res. React. Inst., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】大豆タンパク質は、豆腐などの大豆加工食品の物性に影響を及ぼすばかりでなく、他の食品の物性を改良するための食品素材としても利用されており、大豆タンパク質の機能性を向上させるためには、その構造と物性の関連を明らかにすることが重要である。これまで、孤立した大豆タンパク質の構造に対する知見が超遠心分析や X 線結晶解析などの手法を用いて得られてきたが、実際の食品中においてはタンパク質は濃厚な水和凝集体となって物性発現に寄与しており、さらに温度や pH などの変化によって大きくこれらが変化することから、周囲の環境変化に伴って大豆タンパク質の水和凝集体に誘起されるナノメートルスケールの構造変化を *in situ* で捉えることが、より実態に即した大豆タンパク質の物性の理解のためには不可欠である。我々はこれまで、小麦タンパク質グリアジンの濃厚凝集体のナノ構造解析に X 線小角散乱法 (SAXS)を適用し、凝集体中で形成される階層構造を明らかにするなどの成果を得た。そこで本研究では、主要な大豆タンパク質 β-コングリシニンおよびグリシニンの水溶液について SAXS による構造解析を行い、加熱処理の温度による構造の相違を調べるとともに、充填豆腐の製造に用いられるグルコノ-δ-ラクトン(GDL)の添加に伴う構造の時間変化を~100 nm のスケールで追跡した。
【方法・結果】大豆タンパク質は、乾燥大豆(エンレイ)の粉末をヘキサンにより脱脂し 2-メルカプトエタノール添加による還元条件下で蒸留水中に抽出した後、等電点沈殿法によりグリシニン、β-コングリシニンの順に回収した。SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設 Photon Factory のビームライン BL 10C で実施した。測定試料はポリイミドフィルムを窓材とする光路長 1 mm のアルミニウムセルに入れ、X 線の波長 1.488 Å、カメラ長 2 m、散乱ベクトル q の範囲 0.05–2.5 nm^{-1} で測定を行った。濃度 3%の β-コングリシニン水溶液について、熱処理温度の違いによる構造変化を調べたところ、60℃付近から熱変性が生じ始め、70℃でサブユニット構造に起因する規則的な構造が完全に失われることがわかった。一方、グリシニンについてはこの変化が不明瞭であり、β-コングリシニンと比較してより複雑な構造を取ることを示している。異なる温度で熱処理を行った β-コングリシニンについて、25℃での GDL 添加による時間変化を測定したところ、前処理温度が 50℃において、5–10 nm に相当する構造を維持したまま 30 nm 以上の大きな構造変化のみが生じており、サブユニット構造を保持しつつ凝固が進行することがわかった。一方 100℃で前処理を行うと、熱変性によってサブユニット構造が消失し、GDL によって全体として 1 つの大きな凝集体が形成されることがわかった。

soy protein, coagulation, small-angle X-ray scattering

発表責任者：佐藤信浩（sato-n@rri.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B08a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B08 会場

米アルブミンの熱安定性とそのメカニズム

Thermal stability of rice albumin and its mechanism

○濱田 彩[1]、藤澤 望[1]、稲 成信[1]、秋間 彩香[2]、山口 勇将[1]、赤尾 真[1]、熊谷 仁[2]、熊谷 日登美[1]
([1]日大・生資科、[2]共立女子・家政)
○Aya HAMADA[1], Nozomi FUJISAWA[1], Shigenobu INA[1], Ayaka AKIMA[2], Yusuke YAMAGUCHI[1], Makoto AKAO[1], Hitoshi KUMAGAI[2], Hitomi KUMAGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】食品に含まれるタンパク質には様々な生体調節機能を有するものが知られているが、一般的に加熱により変性・凝集し、その機能が失われてしまうため、加熱を伴う殺菌や調理工程においてはその取扱いに注意が必要である。当研究室では、水溶性タンパク質である米アルブミンが、難消化性であり、食物繊維様のグルコース吸着性を示し、食後血糖値上昇を抑制することを報告してきた[1)]。この米アルブミンを食品に利用する際にはその熱耐性に関する情報が不可欠である。そこで本研究では、米アルブミンの熱安定性をα-アミラーゼ阻害活性測定、示差走査熱量測定（Differential scanning calorimetry: DSC）により評価し、そのメカニズムについて検討した。
【方法】米粒を粉砕後、pH 6.0 の緩衝液でタンパク質を抽出し硫安分画によりアルブミン画分を分離した。これを水に対して透析し、凍結乾燥により米アルブミン粉末を得た。α-アミラーゼ阻害活性測定では、0.1～10%米アルブミン溶液を試料として用いた。試料を 100℃で 10～120 分間あるいは 121℃で 20 分間加熱後、一定濃度に希釈し、遠心分離にて凝集したタンパク質を除去した。この上清を用いてα-アミラーゼ阻害活性を測定した。阻害活性は、加熱試料を添加した時のα-アミラーゼ活性を、試料無添加の時の活性で割り、この値を 1 から差し引くことにより求めた。また、米アルブミンは 14～16 kDa のタンパク質の集合体であるため、各試料の SDS-PAGE のバンドから変性したタンパク質を確認した。DSC 測定では、20%米アルブミン溶液または米アルブミン溶液にジチオスレイトール（DTT）を加えて一晩保持したものを試料として用いた。さらに、比較として牛血清アルブミン（BSA）とホエータンパク質の測定も行った。測定は試料を銀 pan に入れ、昇温速度 1℃/min で室温から 125℃まで昇温した。Reference には水または DTT 溶液の入った銀 pan を用いた。
【結果】米アルブミンのα-アミラーゼ阻害活性は、0.1%では 121℃で 20 分間加熱してもほぼ 100%を保っていたが、米アルブミン濃度の増加に伴い低下した。SDS-PAGE の結果、タンパク質濃度に依存して 14 kDa のバンドが薄くなったことから、変性したタンパク質は 14 kDa であると推察された。DSC 測定において、米アルブミンは、BSA、ホエータンパク質と比較し、熱変性に伴う吸熱ピークが高温側で観察された。また、DTT 処理米アルブミンは未処理米アルブミンと比較し、吸熱ピークが低温側で観察された。以上のことから、米アルブミンは他の食品タンパク質と比べ熱安定性が高く、分子内ジスルフィド結合が米アルブミンの熱安定性の保持に寄与していることが示された。
【参考文献】1) Ina *et al*., *J. Agric. Food Chem*., **64**, 4882−4890 (2016)

Rice albumin, thermal stability, S-S bond

発表責任者：熊谷　日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B08a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B08 会場

製麺中におけるＳＳ結合形成に対するＰＤＩの影響について

Effect of the PDI for SS bonds formation in noodle quality

○山田 大地[1]、野口 智弘[2]、岡 大貴[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Daichi YAMADA[1], Tomohiro NOGUCHI[2], Daiki OKA[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Fac.Biosci., FPC, Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

グルテンは、小麦粉に水を加えて混捏することで、貯蔵タンパク質のグリアジンとグルテニンが水和、会合し形成され、小麦粉生地の粘弾性やコシに重要な役割を示す。また、グルテンの形成にはジスルフィド結合（SS 結合）が重要であることが知られ、我々はこれまでに小麦粉生地形成における SS 結合形成に小麦粉内在酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）が関与することを報告し、PDI の作用により製パン性が向上することを報告している。一方で、同じく小麦粉製品である麺に対する PDI の影響については研究例が少ない。そこで本研究では、PDI による SS 結合形成と製麺性との関係について検討を行った。

【方法】

小麦粉は「きたほなみ」（江別製粉社）を用いた。PDI は小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。製麺は PDI 無添加および PDI25U/小麦粉 100g 添加にて実施し、ロール式製麺機を用い、加水率 35%にて調製した麺帯を 20℃で 1 時間熟成した。その後、麺帯の圧延し、厚さ 2.5 ㎜、幅 3 ㎜に切り出した麺線を生麺とした。また、生麺は沸騰水にて 7 分茹で処理を行い、茹で麺とした。物性は生麺を引張試験、茹で麺を 90%圧縮試験にて測定した。製麺におけるタンパク質挙動の変化を観察するため、小麦粉および麺線を凍結乾燥しタンパク質の抽出に用いた。抽出には 0.1M NaCl および 3mM EDTA を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）、70% エタノール、2% SDS および 3mM EDTA を含む同緩衝液、または 2% SDS、10mM DTT および 3mM EDTA を含む同緩衝液を使用した。各タンパク質抽出画分のタンパク質量は DC Protein assay(Bio-rad 社)にて測定した。

【結果】

生麺の伸展性は、PDI 添加によって減少した。一方、茹で麺では、90%圧縮試験による応力が PDI 添加により増加し、麺の硬さおよびコシが向上した。タンパク質の溶解度試験を行ったところ、製麺の進行に伴い SDS 抽出画分が減少した。また、PDI 添加麺では SDS 画分が顕著に減少し、SDS＋DTT 抽出画分が増加したことから、PDI の作用により、SS 結合の形成が促進されタンパク質の溶解性が変化した。

PDI, disulfide bond, noodle quality

講演番号：3B08p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B08 会場

LC-MS/MS を用いたキラルメタボローム分析法の開発と食品分析への応用

Development of an LC-MS/MS method for targeted chiral metabolomics and application to food analysis

○中野 洋介、谷口 百優、福崎 英一郎（阪大院・工）
○Yosuke NAKANO, Moyu TANIGUCHI, Eiichiro FUKUSAKI (Osaka Univ.)

光学異性体どうしで生理学的活性が異なるものがあることは一般的に良く知られており、食品研究においては、D-アミノ酸と L-アミノ酸で呈味が異なることに着目し、D-アミノ酸を新たな呈味物質として利用する試みが行われ始めている。多くの光学異性体はほぼ等しい物理化学的性質をもつことから、通常の手法ではそれらの分離分析が困難である。そのため、従来の光学異性体選択的分析手法では、ターゲット化合物の誘導体化といった特殊な前処理を行うことで、望ましい分離や感度を得ている一方、分析の煩雑性やスループットの点で改善すべき問題が多い。近年、我々は光学分割能のあるクラウンエーテルを固定相にもつ分離カラムを利用した液体クロマトグラフータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて、誘導体化を行わずに高感度にタンパク質構成アミノ酸鏡像体を分離分析できる手法を構築したが、本研究では非構成タンパク質アミノ酸や核酸代謝物および生理活性アミンなどおよそ 120 種類の化合物にまで対象を広げ、さらに MS/MS パラメーターの最適化を詳細に行うことで、高感度かつ高再現性を示すハイスループットな分析系を構築した。また、本手法を食品分析に供し、D-アミノ酸をはじめとする極低濃度の代謝物の測定に成功し、結果としてキラリティーを考慮した興味深い代謝物情報が得られた。これらの結果は、本手法が食品を初めとする様々なサンプルのキラルメタボローム解析に応用できる新規分析手法として大きな可能性を有することを実証した。

LC-MS/MS, D-amino acid, food metabolomics

講演番号：3B08p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B08 会場

Analyzing the molecular mechanism of inhibition of bovine norovirus infection by bovine lactoferrin

○Chaoyue HU[1], Tomoki SHOJIMA[1], Yukie KATAYAMA[1], Michio SUZUKI[1], Hiroshi KAWAKAMI[2], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoritsu Women's Univ.)

[Background and Objectives]

Norovirus (NV) is the leading cause of non-bacterial acute gastroenteritis infecting humans and other animals worldwide. Bovine norovirus (bNV), belonging to genogroup III, causes calf diarrhea of a long duration. There is no specific and effective medicine to NVs yet. The major capsid protein (VP1) was expressed by using recombinant expression system, which led to successful assembly of virus-like particles (VLPs). VP1 can be divided into the S-domain at the N-terminus and the P-domain at the C-terminus. The S domain has a smooth surface and cannot bind to the animals' receptor. Compared with VLPs, consisting of the full-length VP1, the P domain is usually present in the form of dimer and it has better binding abilities than VP1. Lactoferrin (Lf) is an innate immune system glycoprotein of mammals and it displays many biological functions related to antiviral and antibacterial activity. The objective of this study is to investigate whether bovine Lf (bLf) has protective effects against norovirus infection by examining the molecular interactions among bLf, the P domain of bNV (bNV-PD) and the carbohydrate ligand of bNV (bNV-CL).

[Methods and Results]

Recombinant bNV-PD was expressed in *E. coli* and purified by immobilized Ni affinity chromatography and size exclusion chromatography. Three kinds of binding assays are now in progress: (1) the binding assay of bLf and bNV-PD to determine whether bLf inhibits bNV infection by attachment to bNV, (2) the binding assay of bLf and bNV-CL to detect the potential mechanisms of protection against bNV infection, (3) the binding assay of bNV-PD and bNV-CL to further understand the infection mechanism of bNV. The results of these binding assays will be presented.

Lactoferrin, P domain, binding assay

講演番号：3B08p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B08 会場

ロタウイルス増殖抑制活性を示す牛乳ラクトフォリンの分子基盤
The molecular basis of bovine lactophorin, which shows inhibitory activity against rotavirus infection

○遠藤 江美[1]、大野 翔平[1]、小林 純子[2]、山田 佳太[3]、中川 智行[1]、矢部 富雄[1]、鈴木 徹[1]、中込 とよ子[4]、中込 治[4]、稲垣 瑞穂[1]([1]岐阜大応用生物、[2]北大学院医、[3]大阪大谷大薬、[4]長崎大院医歯薬)
○Emi ENDO[1], Shohei OHNO[1], Junko KOBAYASHI[2], Keita YAMADA[3], Tomoyuki NAKAGAWA[1], Tomio YABE[1], Tohru SUZUKI[1], Toyoko NAKAGOMI[4], Osamu NAKAGOMI[4], Mizuho INAGKAKI[1]
([1]Gifu Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Osaka Ohtani Univ., [4]Nagasaki Univ.)

【目的】我々はこれまでに、牛乳乳清に含まれる糖タンパク質ラクトフォリン（LP）が乳幼児下痢症の主因であるロタウイルスに対して増殖抑制活性を示すことを報告してきた。LP は 28kDa フラグメント（LP28）とそのプラスミン加水分解により生じる 18kDa フラグメント(LP18)で構成され、いずれのフラグメントにおいても活性が確認されている。LP28 と LP18 に共通する特徴的な構造として、タンパク質高次構造、Asn77 位の *N*-結合型糖鎖および Ser/Thr86 位の *O*-結合型糖鎖修飾が挙げられる。本研究では、LP18 のロタウイルス増殖抑制活性に寄与する分子基盤を明らかにするため、タンパク質高次構造の破壊および LP を修飾する *N*-結合型糖鎖の切除を行い、LP18 の示す活性に与える影響を検証した。

【材料と方法】①LP のタンパク質部分が活性を担っているかを調べるため、LP18 を Proteinase K（EC 3.4.21.64）で処理し、タンパク質高次構造を破壊し断片化した（ProK）。②LP18 に修飾された *N*-結合型糖鎖が活性に与える影響を調べるため、*N*-glycosidase F（EC 3.5.1.52）で *N*-結合型糖鎖を酵素的に切断した（Ngly）。抗ロタウイルス活性の測定には、アカゲザル腎臓上皮細胞 MA104 にヒトロタウイルス MO 株（G3P[8]）を接種して感染させる実験系を用いた。様々な濃度に段階希釈した LP 派生サンプル（ProK, Ngly）とヒトロタウイルス MO 株を混合し、細胞に 1 時間吸着させた後、維持培地に置き換えた。吸着 16 時間後に固定し、間接蛍光抗体法により感染細胞数をカウントした。培地に被験物質を添加しない場合を対照として対照群の HRV 感染を 50%阻害する被験物質の濃度を最小阻害濃度（MIC）で示した。

【結果と考察】①酵素消化後の ProK も活性が保持されていた。サンプル中の ProK 濃度の減少に伴い顕著な活性の減少が見られた（MIC;LP18 43 μg/ml, ProK 63 μg/ml）。したがってタンパク質部分が活性の主体を担っていないと考えられた。②Ngly については LP18 と比較して若干の活性低下が認められたが、依然として、ウイルス増殖抑制活性を保持していた(MIC; Ngly 157 μg/ml)。*O*-結合型糖鎖の切断については現在検討中である。

glycoprotein, rotavirus, N-glycan

発表責任者：稲垣　瑞穂（mizuho@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B08p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B08 会場

似て非なる二種のタイプ 3 銅タンパク質・フェノールオキシダーゼとヘモシアニン

Phenoloxidases and hemocyanins are similar but distinct proteins that belong to type 3 copper protein family

○増田 太郎[1]、河内 達暉[1]、的場 康幸[2]、豊原 治彦[1]、三上 文三[1] ([1]京大院農、[2]広大院薬)
○Taro MASUDA[1], Tatsuki KAWAUCHI[1], Yasuyuki MATOBA[2], Haruhiko TOYOHARA[1], Bunzo MIKAMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】フェノールオキシダーゼ(PO)（またはチロシナーゼ(Ty)）は、チロシン等モノフェノールの *o*-水酸化(mono-PO)反応と、それに続く *o*-キノンへの酸化(di-PO)反応を触媒するメラニン形成反応の鍵酵素である。獲得免疫系を持たない甲殻類は PO によるメラニン形成反応を主要な生体防御反応としているため、その体液中には強い PO 活性が認められ、PO 活性の発露による黒変は甲殻類食品の劣化現象として位置づけられる。PO は活性中心に二核銅中心を有するタイプ 3 銅タンパク質に属し、同じタンパク質ファミリーに属するヘモシアニン(Hc)は甲殻類体液中に多量に存在する酸素運搬タンパク質である。PO と Hc の両者の活性中心は極めて類似していると考えられるため、Hc が PO 活性を獲得し、甲殻類黒変に寄与する可能性が指摘されてきた。本研究では、甲殻類体液中の PO 活性の主体を明らかにすると共に、Hc の PO 賦活化の可否について検討することを目的とした。
【実験方法】食用甲殻類（クルマエビ、イセエビ）の生体より体液を採取し、塩析と各種クロマトグラフィーにより、PO と Hc を単一に精製した。精製 PO, Hc の mono-および di-PO 活性パラメータは、それぞれチラミンとドーパミンを基質としたドーパクロム生成速度を指標に算出し、キノコ由来、及び *Streptomyces* 属細菌由来のチロシナーゼと比較した。また、クルマエビ由来の PO とイセエビ由来の Hc について単結晶を調製し、Spring-8 放射光施設において X 線回折データを取得し、立体構造を決定した。
【結果】甲殻類体液中の Hc, PO は、ともに分子量約 7, 5000 のサブユニットからなる六量体を形成し、紫外可視吸収スペクトルによりオキシ型の二核銅中心を含むことが示唆された。Hc は種を問わず甲殻類体液中に 20mg/ml 以上の高濃度で存在する上、PO と構造も類似していることから既報の精製法で両者を分離することは困難であった。精製 Hc 単独では既報の活性化法で処理した場合も PO 活性を持つには至らなかったことから、甲殻類体液中の PO 活性は、Hc ではなく微量に含まれる PO に由来するものであると結論した。
X 線結晶構造解析の結果から、クルマエビ PO の二核銅を含む活性中心の構造は、銅原子間の距離、銅に対する配位子である 6 つのヒスチジン残基の位置など主要な点について、イセエビ Hc の二核銅中心の構造とほぼ一致していた。しかしながら、PO には、Hc に存在しない分子表面から活性中心に至る芳香族アミノ酸側鎖に縁どられたクレフトが存在しており、PO と Hc における活性の差は、二核銅中心への基質のアクセスが決定要因の一つになっている可能性が示された。

tyrosinase, hemocyanin, type 3 copper protein

発表責任者：増田太郎（masutaro@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B08p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B08 会場

小麦 LOX アイソザイムの発現, 精製, 特性評価

Expression, purification, characterization of wheat LOX isozymes

○谷川 翼[1]、佐藤 甫之[4]、今村 未央[2]、白石 玲[4]、菅原 紘貴[3]、夏目 亮[2]、椎葉 究[4]([1]東電大・工、[2]東電大・院・工、[3]東電大・理工、[4]東電大・院・理工)
○ Tsubasa TANIKAWA[1], Motoyuki SATOU[4], Mio IMAMURA[2], Akira SHIRAISHI[4], Hiroki SUGAHARA[3], Ryo NATSUME[2], Kiwamu SHIBA[4] ([1]CSE, Tokyo Denki Univ., [2]GSE, Tokyo Denki Univ., [3]CST, Tokyo Denki Univ., [4]GST, Tokyo Denki Univ.)

＜背景および目的＞

小麦リポキシゲナーゼ(小麦 LOX)は、不飽和脂肪酸を酸化させるはたらきをもつ酵素である。小麦粉生地(ドウ)中に LOX を添加すると、連鎖的な酸化反応を生じ、製パン性が改良されることが示唆されている。一方、小麦 LOX には少なくとも 3 種類のアイソザイムが存在することが知られている。しかし、各アイソザイムの製パン改良性に寄与する度合いや性質の違いについては明確ではない。我々は、製パン改良剤として小麦 LOX アイソザイムを応用することに着目している。本研究では、3 種の小麦アイソザイム LOXⅠ, LOXⅡ, LOXⅢを組換え発現・精製し、それぞれの特性を評価する。得られた結果に基づいて、製パン改良性が優れたアイソザイムを選別することを目的としている。

＜実験方法および結果＞

・大腸菌を宿主とする組換え発現に適した配列を有する LOXⅠ, LOXⅡ, LOXⅢの遺伝子を合成した。これらを用いて、N 末端に His-tag が融合した LOX が発現するプラスミドを構築した。それぞれの His-LOX 発現プラスミドで大腸菌 BL21 株を形質転換した。His-LOXⅠ, His-LOXⅡについては、組換え大腸菌を 37℃で 3h 振とう培養し、氷冷処理による発現誘導後、15℃でさらに 15h 振とう培養して発現させた。His-LOXⅢについては、上記の操作に加え、発現誘導時に IPTG を添加して発現させた。菌体破砕上清からの各 His-LOX の精製は、Ni アフィニティーで行なった。
・研究が先行していた His-LOXⅡについては、さらにゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。得られた His-LOXⅡを、室温下で酢酸バッファー(pH 5.5)中でリノール酸基質と反応させたところ、反応産物であるリノール酸ヒドロペルオキシドの生成が確認された。
・His-LOXⅠ, His-LOXⅢについても現在、不飽和脂肪酸に対する酸化活性を調べている。His-LOXⅡと同様に His-LOXⅠあるいは His-LOXⅢをドウ作製時に添加して、添加するアイソザイムの違いによるグルテニン構成への影響や、小麦粉二次加工性への影響を調べて、不飽和脂肪酸に対する酸化活性との相関性について議論する。

Lipoxygenase, Isozyme, Baking quality

発表責任者：夏目亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3B08p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B08 会場

碁石茶製造工程における環状ジペプチド生成機構の解明

Elucidation of formation mechanism of cyclic dipeptides during Goishi tea production

○大塚 祐季[1]、山本 憲司[1,2]、有田 光[1]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[3]([1]高知大・農、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株）、[3]高知大・地域セ)
○Yuuki OTSUKA[1], Kenji YAMAMOTO[1,2], Hikaru ARITA[1], Takehiro KASHIWAGI[1], Tomoko SHIMAMURA[1], Hiroyuki UKEDA[3] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Suntory Global Innovation Center Limited, [3]Center for Regional Collaboration, Kochi University)

【目的】碁石茶は、高知県長岡郡大豊町において好気的発酵と嫌気的発酵を経て生産される世界的に見ても珍しい二段階発酵茶である。一方、環状ジペプチドは、直鎖ジペプチドの N 末端、及び C 末端が脱水縮合したジケトピペラジン構造（DKP）を基本骨格とする物質群であり、食品加工の焙煎や発酵工程で生じることが知られている。DKP はこれまで苦味成分として認識されてきたが、近年ではセロトニン再取り込み阻害活性や学習意欲改善効果など種々の生理活性が報告され、機能性成分としても注目されるようになった。我々は、この DKP がプーアル茶等の微生物発酵茶（後発酵茶）に含まれることを明らかとし、特に碁石茶が高い DKP 含有量を示すことを報告した [1,2]。本研究では，碁石茶製造工程における DKP の生成機構について考察した。
【方法】乾燥茶葉粉末 2 g に対して 200 g の熱湯を加え、10 分間撹拌後にろ過したものを碁石茶抽出液とし、分析に供した。DKP の分析は LC-MS/MS (Waters 社製)で行い、カラムには Waters Atlantis T3 (2.1 mm i.d.×150 mm)、溶離液にはアセトニトリルと 0.1% ギ酸を用いた。31 種類の DKP を分析対象とし、各 DKP の$[M+1]^+$を Precursor ion とし、検出感度の良好な Product ion を Target ion として MRM で測定を行った。碁石茶抽出液中のペプチド量はアミノ基量を指標とし、TNBS 法にて測定した。
【結果及び考察】碁石茶抽出液の DKP 含量は、蒸し、好気的発酵、嫌気的発酵、天日干しの工程の進行に伴い増加し、天日干し後には 21 種類の DKP が検出された。製造工程中のペプチド量、及び pH の変化を調べたところ、ペプチド量は好気的発酵の途中から嫌気的発酵まで増加する傾向を示した。この傾向は DKP 含量の変化と一致していたことから、好気的発酵、及び嫌気的発酵に関与する微生物によるタンパク質の分解が DKP の生成に大きく影響すると考えられた。また、pH は製造工程の進行に伴い低下する傾向を示し、乳酸菌が関与する嫌気的発酵時に大きく pH が低下した。この pH の変化も DKP 生成を促す重要な因子であると推察された。加えて、茶中に豊富に含まれる可溶性タンパク質の一種である RubisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) の一次構造と碁石茶抽出液において検出された DKP の構成アミノ酸との比較を行ったところ、良好な一致を示した。以上のことから、碁石茶中の DKP の生成には、微生物由来のプロテアーゼ活性、及び pH が重要な役割を果たしていることと考えられた。

1) Yamamoto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 172-177 (2016)
2) 大塚他，日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）

Cyclic dipeptide, Post-fermented tea, Diketopiperazines

発表責任者：大塚祐季（kouchiootsuka77@gmail.com）

講演番号：3B08p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B08 会場

市販魚醤の製法による含有成分の差異

Evaluation of various Koratura

○日高 宗明[1]、向井 文二[1]、西田 優友[1]、菊池 恭[1]、磯田 勇樹[2]、寺田 央子[1]、鈴木 彰人[1]([1]九州保健福祉大学、[2]いそ田)
○Muneaki HIDAKA[1], Bunzi MUKAI[1], Yusuke NISHIDA[1], Kyo KIKUCHI[1], Yuki ISODA[2], Yoko TERADA[1], Akito SUZUKI[1] ([1]Kyushu University of Health and Welfare, [2]Isoda Co., Ltd.)

【目的】魚醤は魚介類と食塩を混合し、魚介類に存在する自己消化酵素および細菌などによる発酵により製造される調味料である。アミノ酸、脂質などの含有成分により、魚醤の旨みや香りに差が生じることが知られており、これらは原材料や製造法、製造地域の気候により変化すると考えられている。これらの要因と含有成分についての詳しい関連性はまだ明らかになっていない部分も多い。そのため、今回は製造法に注目し、製造法と含有成分の関連性について検討を行った。

【方法】カタクチイワシ属を原材料とする市販魚醤 9 種(日本産 5 種、イタリア産コラトゥーラ 4 種)を実験材料として用いた。我々は、イタリアシチリア島の伝統的な製造法を参考にして独自の魚醤を作成したため、イタリア産を比較として選択した。製造業者の HP もしくは商品ラベルに記載された情報より、原材料、添加物、製造法を収集した。また、対照として、無添加丸大豆生しょうゆ(フンドーキン醤油株式会社)を用いた。これらのサンプルについて、味や香りとの関連性が高いとされている、塩分、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、タンパク質の分析を行った。濃度測定は、電位差滴定、測定用キット、HPLC、電気泳動法などの各成分に適した機器・手法を用いた。

【結果】代表的な成分として、塩分濃度は 17%～24%、グルタミン酸濃度は 14～28 mg/mL、クエン酸濃度は 5～16 mg/mL の範囲であった。グルタミン酸は、長期熟成により減少する傾向があり、またイタリア産の方が日本産より高い傾向が得られた。一方、クエン酸は、日本産の方がイタリア産よりも高い傾向が得られた。酒粕などの添加物を加えている商品では、グルタミン酸濃度および総タンパク濃度が他の商品と比べ低かった。

【考察】いくつかの成分は製造法および製造期間と相関する結果が得られた。さらに今回得られた成分の結果は、「旨みを感じる商品ではグルタミン酸濃度が高い」、「魚の臭みを強く感じる商品では脂肪酸濃度が高い」など、官能試験の結果と相関性が高かったことから、製造法、製造期間を調整することで目標とする味・香りに近付けることが可能であると考えられた。効率的な商品開発を行うために、さらなる検討が必要である。また、日本産とイタリア産の商品での差は、同様の製造方法でも異なっていたため、近海に棲息しているカタクチイワシ属や気候の差異などが原因であると考えられる。

Koratura, Analysis, manufacturing method

発表責任者：日高宗明（mhidaka@phoenix.ac.jp）

講演番号：3B08p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟南 B08 会場

シイタケに含まれるレンチニン酸の分析

Analysis of lentinic acid in shiitake mushrooms

○藤澤 望、中条 早紀、營田 雄大、権守 千晴、山口 勇将、大槻 崇、赤尾 真、松藤 寛、熊谷 日登美（日大・生資科）
○ Nozomi FUJISAWA, Saki NAKAJO, Yuta TSUKUTA, Chiharu GONMORI, Yusuke YAMAGUCHI, Takashi OTSUKI, Makoto AKAO, Hiroshi MATSUFUJI, Hitomi KUMAGAI (Nihon Univ.)

【目的】シイタケ(*Lentinula edodes*)は我が国の代表的な食用キノコであり、特徴的なフレーバーを有している。このフレーバーはレンチオニンを主成分とした環状硫黄化合物であり、当研究室では、レンチオニンが、血小板凝集抑制作用、肝障害抑制作用など様々な薬理効果を示すことを報告している。レンチオニンは、シイタケの組織が破壊されることでレンチニン酸(Figure 1)に γ-グルタミルトランスフェラーゼ(γ-GT)等の酵素が作用することにより生成する。従って、シイタケ中に含まれるレンチニン酸含量が定量できれば、生成するレンチオニン量を推定することができる。また、レンチニン酸の生合成経路は明らかになっていないが、これがグルタミン酸とシステインを主骨格とした修飾ジペプチドであることから、シイタケ中のレンチニン酸含量は、生育環境のアミノ酸の存在比等に影響を受ける可能性もあり、シイタケの品質を保証する上での指標の一つとなると考えられる。そこで本研究では、LC/MS を用いてシイタケ中のレンチニン酸の分析を試みた。
【方法・結果】生シイタケをメタノール-水混液(3：1)で抽出後、得られた抽出液を Fmoc 化し LC/MS で分析した。その結果、トータルイオンクロマトグラムの複数のピークの中から、Fmoc 化レンチニン酸(*m/z* 705 ($[M + H]^+$), 703 ($[M - H]^-$), Figure 1)と推定されるピークを見出した。また、生シイタケから得られた抽出液を γ-GT 処理後、Fmoc 化した試料溶液では、その面積値が大きく減少した。したがってこのピークは Fmoc 化レンチニン酸であることが判明した。
次に、シイタケ中のレンチニン酸の分析における抽出条件の検討を行った。抽出溶媒として熱水または、メタノール-水混液(3 ： 1)を用いて検討したところ、両者に大きな違いは認められなかった。抽出物の作製における溶媒除去の容易さを考慮すると、シイタケ中のレンチニン酸の抽出にはメタノール-水混液(3 ： 1)がより適していると考えられた。
これらの抽出条件および測定条件を用いて、同一品種で栽培方法(原木または菌床栽培)の異なるシイタケ中のレンチニン酸含量を測定した。その結果、菌床栽培のシイタケは原木栽培のシイタケと比べ比較的レンチニン酸含量が多いことが明らかとなった。また、原木栽培により得られた品種の異なるシイタケ４種類について同様に検討したところ、品種間でレンチニン酸含量は異なり、最大５倍ほどの違いが認められた。

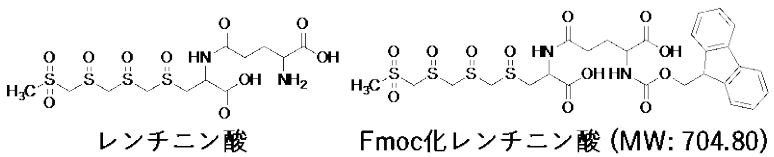


Figure 1

Lentinic acid, Shiitake mushrooms, analysis by LC/MS

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B09a01
講演日時：3 月 17 日 09:00～ 共通講義棟南 B09 会場

「超高温短時間殺菌」と「脂肪粒径の低下」を組み合わせたヨーグルト新製法の開発

Development of new yoghurt manufacturing method combining "ultra high temperature short time sterilization" and "fat globule size reduction"

○市村 武文、長田 堯、髙井 めぐみ、米倉 久美子、高木 奈緒、市場 智子、堀内 啓史 (株式会社 明治)
○Takefumi ICHIMURA, Takashi OSADA, Megumi TAKAI, Kumiko YONEKURA, Nao TAKAGI, Tomoko ICHIBA, Hiroshi HORIUCHI (Meiji Co.,Ltd.)

【目的】
良好な食感とヨーグルトカード品質（強度）が得られるセットタイプヨーグルトの製造方法として、「超高温短時間殺菌（130℃殺菌）」と「脂肪粒径の低下」を組合せた新製法を開発した。我々は、130℃殺菌を経たミックスを用いたヨーグルトは、食感のなめらかさにおいて非常に優れたものが得られることを認めたものの、カード強度が大幅に低下する課題が存在した。しかしながら今回、ミックスの脂肪粒径を低下させることで、「130℃殺菌」の課題を解決できることを見出し、実用化に至った。その検討内容について報告する。
【方法】
生乳の脂肪粒径（メディアン径）ならびに殺菌条件を 1.0μm,95℃（通常条件:①）、1.0μm,130℃（②）、0.6μm,130℃（③）に調製したミックスを、発酵・冷却することでヨーグルトを得た。官能評価においては、（①）と（②）ならびに（①）と（③）の組合せについて、相対評価にて風味特性を評価した。カード強度の評価においては、カードの破断応力（カードメーター）、横倒し耐性、輸送耐性（振動試験機）について評価した。構造観察においては、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）にて脂肪分・タンパク質の分布について観察した。
【結果および考察】
官能評価の結果、95℃で殺菌したミックスを用いたヨーグルト（①）と比較し、130℃で殺菌したミックスを用いたヨーグルト（②）は「なめらかさ」「総合評価」等で高い評価を得た。また、130℃殺菌のミックスにおいても、脂肪粒径が 0.6μm のもの（③）は 1.0μm のもの（②）と比較し、「濃厚感」「食べごたえ」等の評価が高まっていた。物性測定においては、130℃殺菌で脂肪粒径が 1.0μm のもの（②）は破断応力・横倒し耐性・輸送耐性の全てにおいて低い評価となった一方で、130℃殺菌で脂肪粒径が 0.6μm のもの（③）は、95℃殺菌で脂肪粒径が 1.0μm のもの（①）と比較し、同等以上の評価を得た。CLSM の観察結果から、130℃殺菌で脂肪粒径が 0.6μm のもの（③）は、脂肪粒子がたんぱく質のネットワーク内に介在する傾向が示唆され、これがカード強度を高める要因と推察された。以上の結果から、「130℃殺菌」ならびに「脂肪粒径の低下」を組合せることで、良質な食感とカード品質を両立させた、優れたセットタイプヨーグルトが得られることが明らかとなった。

yogurt, fat globule size, ultra high temperature short time sterilization

発表責任者：市村武文（takefumi.ichimura@meiji.com）

講演番号：3B09a02
講演日時：3 月 17 日 09:11～ 共通講義棟南 B09 会場

脂肪粒径の異なるヨーグルトの食感の解析～構造・物性相関のメカニズムの解明～
Analysis of the texture of yoghurt with different fat globes size ~ Elucidation of the mechanism of structure - property relationships ~

○日下 舞[1]、河原井 紹博[2]、市村 武文[3]、高井 めぐみ[3]、中村 卓[2]([1]明治大院農・農化、[2]明治大農・農化、[3](株)明治)
○ Mai KUSAKA[1], Akihiro KAWARAI[2], Takefumi ICHIMURA[3], Megumi TAKAI[3], Takashi NAKAMURA[2] ([1]Meiji Grad.Sch., [2]Meiji Univ., [3]Meiji Co.)

【目的】ヨーグルトのおいしさにとって食感は重要な要因である。その食感は食品構造を咀嚼によって破壊するときに発現する。そのため、食品構造を理解し破壊過程を知ることは、ヨーグルトの食感が生まれるメカニズムの解明手段となるだけでなく、望まれる食感を実現する指標となる。ヨーグルトの原材料である乳は乳タンパク質を含むエマルション溶液である。エマルションは油滴サイズを変化させることで食感が変化することが多くの食品で知られている。ヨーグルトにおいても、原料乳の脂肪粒径を変化させると食感に影響することが明らかとなっている。しかし、その食感の違いがどのような構造的要因によるかは明らかでない。そこで本研究では脂肪粒径の異なる原料乳を用いてヨーグルトを作成し、その時の食感の違いを破壊過程に着目した物性測定・構造観察から解析することを目的とした。

【方法】脂肪球のメディアン径が 1.0 μm(以下 L)・0.6 μm(以下 S)のヨーグルトミックスを発酵・冷却し、ヨーグルトを作成した。物性測定では、第一咀嚼を想定してクリープメーターを用いた破断強度試験を行った。咀嚼後期過程を想定してレオメーターを用いた動的粘弾性試験を行った。また、構造観察では、未破壊および破壊後のヨーグルトを走査型電子顕微鏡(SEM)と透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。得られた結果については SPSS を用いて統計処理を行った。

【結果および考察】破断強度試験の結果、脂肪粒径の小さいヨーグルト S は L に比べて破断応力が有意に高かった。また、動的粘弾性試験においても S はサンプル L よりも貯蔵弾性率（G’）が有意に高かった。これらのことから、脂肪粒径を小さくすることでヨーグルトにかたさを付与出来ることが明らかとなった。未破壊構造では、SEM 観察で L・S のいずれにおいてもカゼインミセルが数珠状に連なったストランドネットワーク構造が見られた。しかし S では L に比べて太いストランドが多く観察された。また反射電子モードの観察では、L の脂肪球はカゼインミセルよりも大きく、S の脂肪球はカゼインミセルと同じ大きさであった。TEM 観察では、S は L よりもカゼインミセルと脂肪球が集まって存在する部分が多く見られた。さらに、破壊構造でも SEM 観察において違いが見られた。以上の事から、S は脂肪球が小さくなったことで、ストランドネットワークの形成に脂肪球が参加しやすくなり、太いストランドが増加し、くずれにくくかたい食感になったと考えられる。

texture, structure observation, yogurt

講演番号：3B09a03
講演日時：3 月 17 日 09:22～ 共通講義棟南 B09 会場

恒温定速湿度条件下による澱粉被覆フレーバー粉末からのフレーバーの徐放挙動

Flavor release rate from starch coated emulsified flavor powder at the ramping humidity condition.

○高重 至成[1]、四日 洋和[2]、安達 修二[2]、吉井 英文[3] ([1]愛大院農、[2]京学大バイオ、[3]香大農)
○Shisei TAKASHIGE[1], Hirokazu SHIGA[2], Shuji ADACHI[2], Hidefumi YOSHII[3] ([1]Ehime Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ., [3]Kagawa Univ.)

［目的］

フレーバーは食品のおいしさに深く関係し，食品の製造時にさまざまなフレーバーが用いられている．噴霧乾燥による粉末香料の作製においては，噴霧乾燥時のフレーバーおよび粉末の回収率に加え，粉末の貯蔵中のフレーバーの酸化安定性や徐放性などが重視される．粉末の回収率を上昇させるために、噴霧乾燥粉末を澱粉で被覆する研究が行われている．しかし，噴霧乾燥粉末への澱粉の被覆がフレーバー徐放挙動に及ぼす影響に関する詳細な研究はほとんど行われていない．そこで本研究では，噴霧乾燥粉末中のフレーバーの徐放挙動に及ぼす澱粉被覆の影響を明らかにすることを目的として，スクロース（Suc），α-ラクトース（Lac），マルトース（Mal），マルトデキストリン（MD；DE = 40，25，19）を賦形剤として用い，澱粉を被覆した噴霧乾燥粉末を作製し，モデルフレーバーとして用いた *d*-リモネンの徐放挙動を測定した．

［方法］

賦形剤（Suc，Lac，Mal，MD（DE = 40，25，19)），乳化剤（乳蛋白質加水分解物；エマルアップ，森永乳業），抗酸化剤（アスコルビン酸ナトリウム）を蒸留水で溶解したのち，*d*-リモネンと中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール（アクター M-2，理研ビタミン）を添加し，攪拌して O/W エマルションを調製した．つぎに，エマルションを噴霧乾燥機（L-8 型，大川原化工機製）で乾燥し，微細な *d*-リモネン滴を内包する噴霧乾燥粉末を調製した．噴霧乾燥中に，噴霧乾燥機の壁面から澱粉を吹き付け，粉末を澱粉で被覆した．作製した粉末は，目開き 150 μm と 106 μm の篩で分級し，徐放試験に供した．*d*-リモネンの徐放挙動は恒温で湿度を定速で増加する湿度ランプ法により評価した．

［結果および考察］

徐放挙動は賦形剤の種類に依存し，徐放が開始される相対湿度 RH と賦形剤の無水時のガラス転移温度の間に相関が認められた．したがって，相対湿度 RH が徐放速度に及ぼす影響は，吸湿によるガラス転移温度の低下が主因と推察された．また，澱粉を被覆した粉末は，被覆していない粉末と比較し，徐放が開始される相対湿度 RH が高くなった．これらの結果は，噴霧乾燥により粉末を作製する際に，澱粉を被覆することにより，粉末からのフレーバーの徐放速度を制御できる可能性を示唆した．

flavor, spray-dried powder, spray drying

発表責任者：吉井英文（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3B09a04
講演日時：3 月 17 日 09:33～ 共通講義棟南 B09 会場

「焦がしもろみ製法」による芋焼酎の製造およびその条件の最適化

Production of sweet potato shochu by 'Burnt Moromi Method' and optimization of manufacturing condition

○滝沢 隆一[1]、石原 武雄[2]、潮井 徹[1]([1]サッポロビール株式会社、[2]サッポロホールディングス株式会社)
○Ryuuichi Takizawa[1], Takeo Ishihara[2], Tooru Shioi[1] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]SAPPORO HOLDINGS LTD.)

【目的】
昨今の焼酎品質に対するニーズの高まりから、これまで焼酎の香味を改善する様々な技術が開発されている。良好な香味の芋焼酎の製法に関する検討の一環として、もろみの一部を焦がした「焦がしもろみ製法」による芋焼酎の試験製造を実施した。

【方法と結果】
さつまいも、米麹及び水の混合物を、麹菌由来の酵素反応により糖及びアミノ酸の生成を促進させ（「糖化・溶解ステップ」）、その後、高温処理を行うことでメイラード反応を促進し、香ばしい風味を付与させる（「焦がしステップ」）ことで「焦がしもろみ」を得る。「焦がしもろみ」を発酵中の 2 次もろみに添加し、発酵後に蒸留を行うのが「焦がしもろみ製法」である。
既報では、「糖化・溶解ステップ」を 50℃18 時間、「焦がしステップ」を 105℃90 分と言う条件で試験を実施し、試験品が対照品より官能評価において優れ、焼き芋や熟成酒に含まれるとされる香気成分である 5-メチルフルフラールや 2-メチルブタナールについて、試験品が対照品や市販の焼き芋焼酎より高濃度である事を報告した[1]。
今回我々は、製造実現性と良好な香味実現の両面での最適条件を見出すことを目的として、以下について試験を実施した。
・原料配合比率：米麹と芋のベストバランスの追究
・糖化時間：1 日で焦がしもろみを製造できる条件の確立
・焦がし時間：芋らしい香ばしさを実現できる条件の確立
また、上記最適化条件で製造した焼酎の工程・香味についても評価を行い、その結果についても報告する。

[1]滝沢ら　平成 29 年度 日本醸造学会大会

Burnt Moromi Method, sweet potato shochu, manufacturing condition

発表責任者：滝沢隆一（ryuuichi.takizawa@sapporobeer.co.jp）

講演番号：3B09a05
講演日時：3 月 17 日 09:44～ 共通講義棟南 B09 会場

ウメ未熟果加工時の成分変化に対する中高圧処理の影響
Effect of high-hydrostatic pressure processing on chemical properties in immature Japanese apricot
○藤田 なるみ[1]、藤田 智之[1]、武井 義之[2]([1]信州大院総合理工、[2]ジーエルサイエンス（株））
○Narumi FUJITA[1], Tomoyuki FUJITA[1], Yoshiyuki TAKEI[2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]GL Sciences Co., Ltd.)

【目的】
バラ科果実であるウメは有機酸やポリフェノールなどの機能性成分を豊富に含み、古くから梅干しや梅酒のほかシロップ漬やジャムなどに加工されている。しかし、未熟果には毒性のあるアミグダリンが含まれており、加工に長期間の熟成を要することが知られている。山本らは果実シロップ漬の調製に中高圧処理を用いることで熟成期間を短縮できることを報告している[1)]。また、筆者らは、100 MPa の中高圧条件でウメシロップ漬を調製すると果肉中のクロロゲン酸類が常圧加工に比べて保持されることを見出した[2)]。本研究では中高圧処理の有用性を明らかにすることを目的としてウメシロップ漬加工時の香気成分及び糖組成等の変化を解析し、加工果実への圧力処理の影響を調査した。
【方法】
冷凍保存していたウメ果実を 2 分割し、種を除去して試料とした。果肉と同重量のスクロースと水をチャック付袋に入れ真空脱気後密封し、65 ℃で常圧（0.1 MPa）または加圧（100 MPa）下で 1 時間加工処理した。加工後の果肉を粉砕し、各試料の香気成分を MonoTrap を用いたヘッドスペース法により捕集した。成分抽出液を GC/MS 分析に供し、リテンションタイムとマススペクトルから成分を同定した。さらに、果肉のみで 65 ℃，常圧または加圧下で 1 時間加工処理した。各試料の水抽出液を調製し、各条件における糖組成の変化を測定した。
【結果】
果肉中の香気成分の組成解析から、主な成分として benzaldehyde，linalool，hotrienol を同定した。ウメ果肉では加圧処理により 3 つの化合物のピーク面積値の増加が認められた。特に benzaldehyde のピーク面積値が加圧処理試料で増加した。アミグダリン標品を添加してシロップ漬を加工するとさらに増加したことから、加圧により加水分解反応が進行したことが示唆された。また、加工果肉の糖組成分析の結果、常圧処理に比べて加圧加工でスクロースが減少し、グルコースがそれに伴い増加する傾向が認められた。これらの要因として加圧による果実内酵素反応または有機酸による糖分解の促進が考えられることから、現在反応機構について調査中である。

1）山本ら，日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集，p.1793（2016）
2）藤田ら，日本食品科学工学会 2016 年度大会講演要旨集，p.116（2016）

high-hydrostatic pressure, Japanese apricot, compote

講演番号：3B09a06
講演日時：3 月 17 日 10:05～ 共通講義棟南 B09 会場

日本酒の界面前進凍結濃縮

Progressive Freeze-concentration of Japanese Sake

○宮脇 長人[1]、表 千晶[2]、小柳 喬[2]、笹木 哲也[3]、武 春美[3]、松田 章[3]、北野 滋[4]([1]東京海洋大食品、[2]石川県大生資環、[3]石川県工試、[4]明和工業)
○Osato Miyawaki[1], Chiaki Omote[2], Takashi Koyanagi[2], Tetsuya Sasaki[3], Harumi Take[3], Akira Matsuda[3], Shigeru Kitano[4] ([1]Tokyo Univ. Marine Sci. Technol., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Ind. Res. Inst. Ishikawa, [4]Maywa Co. Ltd.)

［目的］液状食品の濃縮法には蒸発法、膜濃縮法、凍結濃縮法があり、このうち従来法の凍結濃縮法は最も高品質が得られるものの、最も高コストである。われわれは、従来法の多数の微細氷結晶を成長させることにより濃縮を行う懸濁結晶法に対して、系に唯一個の巨大氷結晶を成長させて凍結濃縮を行う界面前進凍結濃縮法を提案しており、システムの大幅な単純化によるコスト低下が期待されている。本研究では、日本酒の濃縮に界面前進凍結濃縮を適用し、濃縮前後の各成分分布の変化について検討することを目的とする。
［方法］市販清酒および日本酒原酒を用い、小型円筒型界面前進試験装置およびスケールアップ装置としての循環流壁面冷却型界面前進凍結濃縮装置（MFC-10, Mayekawa, Tokyo）を用い凍結濃縮を行った。有機酸分析には有機酸分析計（ICS-1500, Thermo Fisher Scientific, Yokohama）を用い、香気成分分析にはガスクロマトグラフ質量分析計（7890A/5975C、Ajilent Technologies, Tokyo）を用いヘッドスペース香気成分分析を行った。
［結果および考察］市販清酒（氷点温度-5.81℃）2000mL を小型界面前進凍結濃縮試験装置で 530mL まで、体積濃縮比 3.77 倍の濃縮を行い、アルコールを 12.5vol-%から 24.0vol-%にまで、また、日本酒原酒（氷点温度-8.37℃）を循環流壁面冷却界面前進凍結濃縮装置を用いて体積濃縮比 3.99 倍の濃縮した結果、アルコールを 17.0vol-%から 27.1vol-%にまで濃縮することができた。
日本酒原酒の界面前進凍結濃縮前後の有機酸分析の結果、有機酸としては、リンゴ酸、乳酸、コハク酸が多く含まれており、これらは凍結濃縮に伴いそれぞれ濃縮されているが、アルコールベースでの濃縮還元後は、濃縮前原酒の成分組成にほぼ完全に回復することがわかった。また、日本酒原酒の界面前進凍結濃縮前後の香気成分分析の結果、主たる香気成分は、酢酸エチル、n-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコールなどであり、これらの成分も、凍結濃縮によりそれぞれ濃縮されているものの、濃縮還元によりほぼ元の組成に回復でき、界面前進凍結濃縮法は成分分布プロフィールをほとんど変化させないことがわかった。このことは、酒類の濃縮において、濃縮後の成分分布の大きく変化する蒸留法と比較して、アルコールのみならず全成分をほぼ同一比率で濃縮することのできる界面前進凍結濃縮法は、新しいカテゴリーのアルコール飲料の製造を可能にすることを意味している。これら、界面前進凍結濃縮酒に対して簡易官能検査を行った結果、いずれにおいても、これまでにない日本酒としての高い評価を得ることができた。

progressive freeze-concentration, Japanese sake, flavor distribution

発表責任者：宮脇長人（osatomiyawaki@yahoo.co.jp）

講演番号：3B09a07
講演日時：3 月 17 日 10:16～ 共通講義棟南 B09 会場

交流高電界加熱による甘酒の高品質殺菌
Inactivation of *Bacillus subtilis* spore in amazake by high electric field alternating current
○筒井 達也[1]、高橋 千栄子[2]、金房 純代[2]、植村 邦彦[2] ([1]栃木県産業技術センター、[2]農研機構)
○ Tatsuya TSUTSUI[1], Chieko TAKAHASHI[2], Sumiyo KANAFUSA[2], Kunihiko UEMURA[2] ([1]Industrial Technology Center of Tochigi Prefecture, [2]NARO)

【目的】甘酒は糖類、アミノ酸類、ビタミン類、ミネラル類を含む日本古来の伝統飲料で、近年その機能性が注目され“飲む点滴”と評されブームが起きている。甘酒の製造元としては従来の大手メーカーを始め、持ち前の麹造りのノウハウを生かした麹甘酒を作る蔵元も増えている。甘酒は前述の通り栄養豊富なことから有害微生物による汚染のリスクが高く、甘酒の安全性及び保存性を向上するためには、甘酒に含まれる可能性のある枯草菌芽胞を失活する殺菌方法を目指した。従来のレトルト殺菌や熱水殺菌で枯草菌芽胞を失活する場合、長時間の高温加熱が必要なことから甘酒の品質劣化を伴うことが問題である。本研究では、果汁の殺菌で実績のある交流高電界処理（HEF-AC）を本殺菌に利用することにより、高品質な甘酒の加工を目指す。
【方法】甘酒は米麹 3kg に 7.5L の水道水を混和し、58℃で 5 時間保温・糖化をさせ Brix20 以上に調整して供した。3L の甘酒に 10mL の枯草菌芽胞懸濁液を添加した原料を、モーノポンプ（兵神装備、4NVL10PU）で 1,000mL/min の一定流速で搬送し、25kHz の周波数の最大 1kV の交流を印加した平衡平板電極（幅 6mm, 長さ 40mm, 電極間隔 5mm）を 0.3s で通過し、原料を 50℃から所定温度（100～120℃）に昇温し、温度保持管でその温度を 1.0 秒間保持後、直ちに 2 重管熱交換器で 40℃まで冷却し、出口のポンプで系内の圧力を 0.6MPa に維持しながら排出した。各電極出口温度のときに得られたサンプル①の枯草菌芽胞を測定し、初期値を基準とした残存率を求めた。次に比較として 80℃以上の温浴中に 15 分間浸漬したサンプル②も同様に測定した。また、未処理の甘酒および HEF-AC 処理したサンプル①、ならびに温浴処理したサンプル②の酵素活性（αアミラーゼ、αグルコシダーゼ及びグルコアミラーゼ活性）を測定した。
【結果】HEF-AC 処理の出口温度が 110℃以上で温度の上昇とともに枯草菌芽胞の失活が大きくなり、125℃以上の出口温度で 1/10000 以下となった。一方温浴サンプルでは 1/100 程度と完全に芽胞菌を失活することはできなかった。HEF-AC 処理したサンプルの酵素活性を生と比べると、80℃では約 15%の活性を残していたが 96℃以上では 5%未満となった。また、HEF-AC 処理による Brix や pH の変化はなく、粘度については処理温度に比例して高まる傾向が見られた。その他、品質変化に関わる項目について発表する予定である。

amazake, *Bacillus subtilis* spore, High electric field alternating current

発表責任者：筒井　達也（tsutsuit01@pref.tochigi.lg.jp）

講演番号：3B09a08
講演日時：3 月 17 日 10:27～ 共通講義棟南 B09 会場

高耐熱性ロングライフ卵黄液の調製とその応用
Preparation of long life egg yolk liquid and its application
○藤新 令奈[1]、中村 朱里[2]、八田 一[1]、乗船 沙紀[3]、豊増 敏久[3] ([1]京女大院家政、[2]京女大家政、[3]天野エンザイム株式会社)
○ Reina FUJISHIN[1], Akari NAKAMURA[2], Hajime HATTA[1], Saki NORIFUNE[3], Toshihisa TOYOMASU[3] ([1]Graduate School of Kyoto Wonen's Univ., [2]Kyoto Wonen's Univ., [3]Amano Enzyme Inc.)

【目的】卵黄は、ビタミンＣと食物繊維以外、全ての栄養素が含まれている高栄養食品である。しかし細菌が繁殖しやすく、すぐに腐敗する。また、卵黄は加熱により 65℃から固まり始め、75℃で完全に凝固する。さらに凍結解凍時には卵黄リポタンパク質が変性しゲル化する。従って、卵黄は加熱滅菌が不可能であり、現在、長期保存可能な卵黄は凍結変性防止剤として砂糖や食塩を用いた 10−30%加糖や 10%加塩冷凍卵黄液しかない。本研究では卵黄の高栄養機能に着目し、室温でも長期保存が可能なロングライフ卵黄液（LL 卵黄液）を調製することを目的とする。そして、LL 卵黄液の応用として、高栄養卵黄飲料の調製、保存性を向上させた LL カスタードクリームの調製を検討した。
【方法】卵黄に耐熱性を付与し滅菌可能とするため、卵黄タンパク質の酵素分解条件を検討した。酵素はアマノエンザイム（株）のサモアーゼ PC10F、プロテアーゼ P、プロテアーゼ A、プロテアーゼ M、プロチン NY100 を用いた。各酵素の活性をそろえ、それぞれの至適温度で 30 分反応させた後、200ml の三角フラスコに入れ 120℃で 1 分間オートクレーブする耐熱性試験を行い、苦味と凝固物の有無で酵素の選定を行った。LL 卵黄液の大量調製は（株）フロンティアエンジニアリング製のジュール加熱装置を用いた。卵黄の 1.5 倍水希釈液（30Kg）を 55℃まで加熱し、サモアーゼ PC10F を卵黄重量の 0.15％添加後、10 分間保持後、さらに 65℃で 30 分間保持し、酵素反応を行った。その後 125℃、3−5 秒間の滅菌を行い、80℃まで冷却してアルミパウチに無菌充填した。LL カスタードクリームの調製は、LL 卵黄液に砂糖・牛乳・薄力粉を加えて、鍋中で混ぜながら 5 分間沸騰させて行った。さらに、LL 卵黄液にビタミンＣ入りの市販飲料と水溶性食物繊維（ファイバリクサ：林原製）を加え高栄養卵黄飲料を調製した。保存試験は LL 卵黄液（5℃、30℃）、カスタードクリーム（5℃）で 8−12 週間保存し一般生菌数を測定した。
【結果】卵黄液の酵素処理において、苦味の生成がなく、120℃の耐熱性が得られたのはサモアーゼ PC10F のみであった。卵黄の 1.5 倍水希釈液にサモアーゼ PC10F を 0.15％添加して酵素反応させることで 125℃での高温滅菌が可能となった。酵素の失活は 100℃、5 分間で完全に失活することが確認された。LL 卵黄液の一般生菌数は 5℃・30℃ともに 12 週間、菌は検出されず、卵黄液の LL 化に成功した。また、通常のカスタードは 5℃保存３週間で腐敗したが、LL 卵黄液使用のカスタードは 8 週間、菌が検出されなかった。高栄養卵黄飲料は市販のリンゴ酢飲料と 1：1 で混ぜ合わせ、1 杯 120ml で卵黄 1 個分の栄養と、食物繊維 13ｇ。ビタミンＣ 60mg の栄養が摂れる完全栄養飲料が完成した。

long life egg yolk, egg yolk protein, enzyme hydrolysis

講演番号：3B09a09
講演日時：3 月 17 日 10:38～ 共通講義棟南 B09 会場

米麹の堆積培養における培養器内の環境が培養状態に及ぼす影響

Effect of the environment in the non-airflow box on substrate condition during koji-making

○谷野 有佳[1]、下山 力生[1]、伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Yuka TANINO[1], Rikio SHIMOYAMA[1], Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co, Ltd.)

【目的】我々はこれまでに無通風箱培養法による製造現場にも応用可能な試験製麹法を構築してきた。この方法は無通風の堆積培養でありながらも、基質の均一な培養状態の維持とその培養期間中の制御を可能にする。この試験製麹を用いて、目的品質の麹を製造するために実際にどのような制御(作業)と品温・水分経過を実現すれば良いのかについての科学的な知見を得ることを目指している。製麹中の品温は基質の発熱と環境への放熱のバランスによるが、これは特に無通風堆積培養時には初期条件や規模に加え、環境の状態に大きく依存することから、適切な製麹工程の管理を実現するためには環境も含めた熱と水分の動態を理解しておくことが必要である。前回の本大会において、堆積厚の違いによる品温経過と酵素生産への影響について、堆積厚を増加させると、最高品温が高くなり、出麹時の水分が増加、酵素生産が減少していることを確認し報告した。本研究では、堆積厚の違いでこのような培養状態の変化が生じる要因を調べるため、発熱および、熱と水分の空間動態について評価を行った。
【方法】精米歩合 60%の雄町 200g および 400g を基質とし、培養開始時に吸水歩合 32wt%になるよう調製した。これに清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 を植え付け、培養器である無通風箱の中に入れた。恒温恒湿槽内で 30℃, 95%RH の環境下で 24 時間培養した後、12 時間かけて 40℃設定まで上昇させ、さらにそのまま 12 時間、計 48 時間培養した。この間、相対湿度は 95%RH を維持した。培養期間中、培養器内の各点における温度を計測し、分布を評価するとともに温度の上昇分から発熱量を算出した。併せて湿度の計測と経時的な基質の水分変化の測定を行った。
【結果】堆積厚を 2 倍にすると基質内の品温のばらつきが若干大きくなっていたが、どちらの堆積厚でも概ね均一な培養状態が維持できていることを確認した。また培養器内の計測結果から、培養器内では発熱に伴い、空気層で対流が生じていることが明らかとなった。堆積厚を 2 倍とすると、高い品温経過になるだけでなく、含水率も高いまま推移しており、体積当たりの蒸発量が減少するとともに、温度上昇から算出される発熱量が増大していた。そして培養器内の空間が小さくなるため、空気層の対流が抑制され、基質からの放熱と水分移動が小さくなっていることがわかった。これらのことが、堆積厚を 2 倍にしたときに品温が大きく上昇する要因であると考えられた。

koji-making, non-airflow box, convection

講演番号：3B09a10
講演日時：3 月 17 日 10:49～ 共通講義棟南 B09 会場

Minimum Heating Pasteurization of Watermelon Puree using High Electric Field Alternating Current

○ Hataichanok KANTRONG[1,2], Sumiyo KANAFUSA[2], Chieko TAKAHASHI[2], Kunihiko UEMURA[2] ([1]Department of Food Processing and Preservation, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, [2]Advanced Food Technology Unit , Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

[Introduction] Watermelon is a typical summer fruit in Japan. It has gain popularity among consumers because of its refreshing taste, attractive color and rich in natural functional compounds. The problem is that fresh watermelon puree is unstable and short shelf life. Normally, conventional heating has been applied to kill microorganisms and extend shelf life of liquid foods. However, it may adversely affect heat sensitive components such as vitamins, color, flavor and taste. HEF-AC process is an emerging technology which combined ohmic heating and high electric field together. This method was successfully used to pasteurize various kind of liquid foods and could also remain more fragrance and nourishment components than conventional pasteurization method.

[Methodology] Fresh watermelon puree was pumped into HEF-AC system at a constant flow rate of 50 liter/hr. Then preheated the temperature of the sample up to 60℃ by heat exchanger before fed into an electric treatment unit. An electric treatment unit was constructed with a parallel plate electrode made of titanium with 5 mm gap between electrodes and a channel insulator made by Teflon. A 12.5 kHz and below 1,000 V AC was applied to the treatment unit. The pasteurization temperature of this system was varied at 70, 90 and 110℃. After that, the qualities of pasteurized samples were analyzed. Vitamin C, lycopene, and the flavor of watermelon puree was analyzed. In addition, microbial inactivation during HEF-AC pasteurization was also investigated.

[Results] The results indicated that watermelon puree treated by HEF-AC method could provide better qualities in terms of color, flavor, vitamin C content and PME inactivation when compare with the conventional thermal processing. *Bacillus subtilis* spore and *Escherichia coli* were reduced when higher HEF-AC process temperature was applied. Thus, it can be concluded that HEF-AC technology could inactivate vegetative microorganisms and heat-resistant microbe spores while preserve heat sensitive components such as vitamin C, color and flavor of watermelon puree.

Watermelon, High Electric Field Alternating Current (HEF-AC), Preserve

発表責任者：Kunihiko UEMURA（uemura@affrc.go.jp）

講演番号：3B09a11
講演日時：3 月 17 日 11:10～ 共通講義棟南 B09 会場

マイクロ波加熱米糠スフェロゾームの挙動

The change of spherozome form from rice bran treated by microwave heating

○市村 怜佳[1]、奥西 智哉[2]、岡留 博司[2]、五月女 格[2]、安藤 泰雅[2]、矢野 友啓[1] ([1]東洋大学、[2]農研機構・食品研)
○Reika ICHIMURA[1], Tomoya OKUNISHI[2], Hiroshi OKADOME[2], Itaru SOTOME[2], Yasumasa ANDO[2], Tomohiro YANO[1] ([1]Toyo Univ., [2]NFRI)

【目的】米糠には約 20 %の脂質が含まれており国産植物油原料として有用であるが、含まれるトリアシルグリセロール(TG)が分解されやすいため貯蔵性に乏しい。米糠中の脂質は貯蔵体であるスフェロゾーム中に存在している。これまでに我々は米糠保存中にリパーゼ活性があっても、マイクロ波加熱によりホスホリパーゼ D(PLD)を失活させることで、脂肪酸度の上昇を抑制できることを報告した。そこで、本報告では米糠へのマイクロ波加熱過程におけるスフェロゾームの粒径分布の経時的変化を検討した。

【方法】玄米を 90 % 精米することによって得られた糠をガラスシャーレに入れ、出力を 500 W に設定した電子レンジで所定時間加熱し、0.25 M スクロース溶液(1 mM モノヨード酢酸、10 mM EDTA を含む)を加え、乳鉢で摩砕しながらスフェロゾームの抽出を行った。得られた抽出液を 25 ℃で所定時間インキュベートし、5 分間遠心分離し沈殿物を除去した。得られた上澄み中に円形に観察されるスフェロゾームの直径をデジタルマイクロスコープで測定し、分布を求めた。これによりスフェロゾームの経時的変化を捉えた。

【結果・考察】無処理糠においてはインキュベートする時間に伴い、大粒径のスフェロゾームが増える傾向がみられた。このことは、スフェロゾーム膜が崩壊し、崩壊したもの同士が融合することで大粒径が増えるという報告と合致していると言える。3 分間処理においては無処理糠同様、大粒径のスフェロゾームが増える傾向であったが、上昇の程度は緩やかであった。これは、我々が以前に報告したマイクロ波加熱処理糠における PLD の挙動と合致しており、PLD 失活により膜崩壊が抑制されたことにより膜の破壊が部分的であったため、スフェロゾーム同士が融合しなかったと考えられる。このことが 3 分間処理糠の脂質分解が見られない主要因であると言える。7 分間処理でのスフェロゾームは抽出直後において既に、フェロゾームが一部崩壊した大粒径で輪郭のはっきりしないものが見られ、これはマイクロ波加熱の影響だと思われる。7 分間処理糠において脂肪酸度の上昇は見られないことをこれまでに報告しているが、この場合リパーゼもほぼ失活していたのでスフェロゾーム膜の損傷があるにも関わらず脂質が分解されなかったと思われる。

マイクロ波加熱を施した米糠中のスフェロゾームは、その後のインキュベータ処理における経時的粒径分布の変化が見られた。ただし、この変化は加熱時間ごとに異なる機序で進行することが示された。

rice bran, membrane of spherozome, enzyme activity

講演番号：3B09a12
講演日時：3 月 17 日 11:21～ 共通講義棟南 B09 会場

中高圧処理によって得られる高圧加工米の機能性成分および物性の評価

Evaluation of nutritional and physical properties of processed rice by High hydrostatic pressure treatment

○佐藤 翼[1]、田中 愼太郎[1]、前川 亜希[2]、宮永 賢[2]、植田 豊[2]、春日 重光[1,2]、織井 孝治[2]、井上 直人[1,2]、藤田 智之[1,2] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大農)
○Tsubasa SATO[1], Shintaro TANAKA[1], Aki MAEKAWA[2], Satoshi MIYANAGA[2], Yutaka UEDA[2], Shigemitsu KASUGA[1,2], Koji ORI[2], Naoto INOUE[1,2], Tomoyuki FUJITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ, [2]Shinshu Univ)

【目的】 玄米の糠層中にはビタミン類やポリフェノール類などの機能性成分が豊富に含まれているものの、玄米食では加工特性や食味が悪く、消費拡大にはつながっていない。一方、糠層の除去された白米食ではこれら成分が欠乏することとなる。著者らは、玄米に加水、加温して 100 MPa 下での中高圧処理を行うことで糠層中のフェノール酸類や添加した色素成分が胚乳中に浸透移行することを明らかにした。本研究では、高圧加工米の生産技術の確立を目的として、高圧加工米中のγ-アミノ酪酸およびビタミン B 群の定量を行った。また、高圧加工米の品質評価として、水浸割粒の調査および炊飯米の食味試験を実施した。
【方法】材料とした玄米は長野県産コシヒカリを用いた。玄米に 56%対玄米重量の水を添加し、55℃、中高圧条件下で 6 時間処理した。処理後の玄米を送風乾燥した後、精米して加工精白米を得た。未処理米および各試料の水抽出液を調製し、３種のビタミン（ニコチン酸，ピリドキシン，チアミン）を LC/MS 分析にて定量した。水浸割粒の測定のため、未処理精白米と高圧加工米をそれぞれ 100 粒ずつトレーにいれ、蒸留水を注ぎ、1 時間までに生じるひび割れ粒、胴割れ粒を測定した。食味試験には IH 炊飯器（Zojirushi NP-YT10）を用いて炊飯を行い、大学集団（n=26，平均年齢 32 歳）および社会人集団（n=29，平均年齢 42 歳）で食味を評価した。
【結果】 未処理玄米および白米中のビタミン B 群（ニコチン酸，ピリドキシン，チアミン）の含有量はそれぞれ 0.486，0.022，0.204 および 0.144，0.010，0.145（mg/米粉 100g）であった。玄米中の含量を 100％とした場合、常圧処理した精白米ではそれぞれ 54,198 および 76%、加圧処理では 54,226，86％となり、いずれの成分においても加水処理による成分の増加が認められた。このうち、ピリドキシンは玄米よりも高い含量を示したことから、加水処理による生合成反応が進行したことが示唆された。
加工精白米の水浸割粒は未処理と加工処理いずれにおいても 15%を下回るレベルとなり、差異は認められなかった。
大学集団と社会人集団に対して食味試験を行ったところ、高圧加工米は未処理の精白米と比べて外観が悪くなる傾向が認められたものの、味に関する違いはほとんどなく、通常米に近い食味であった。また、両集団では同様の傾向が示された。今後は加工精白米中の機能性成分の炊飯による変化について調査を行っていく予定である。

High hydrostatic pressure, brown rice, cooked rice

講演番号：3B09a13
講演日時：3 月 17 日 11:32～ 共通講義棟南 B09 会場

米粉の保管に伴う品質変化挙動

Quality change behavior during storage of rice flour

○山田 昌治、本間 隆広、藤 理沙子、飯高 和、杉山 健二郎（工学院大先進工）
○Masaharu YAMADA, Takahiro HONMA, Risako FUJI, Izumi IITAKA, Kenjiro SUGIYAMA (Kogakuin Univ.)

【はじめに】わが国では近年，食料自給率の観点から，米粉での利用が推進されている。しかし，穀粒を米粉にしたときの品質変化や，保管状態の異なる米の品質変化の差異については十分な検討が行われているとはいえない状況である。本研究では複数の状態で保管した米粉の分析を行い，保管状態による香気の変化とその生成機構を明らかにすることを目的とする。米の香気物質の分析にはガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用い，生成機構の解明のため，電子スピン共鳴(ESR)分析装置を用いてラジカルの測定を行った。
【実験方法】穀物用粉砕機と標準篩を用いて 53～106 μmの米粉を調製した。28 日目まで保管した日本米（コシヒカリ）およびタイ米（ホームマリ）の米粉を 3.0 gずつ採取し，20 mL バイアルに充填し，密閉して一定温度に保つことによって熱平衡化した。この後，バイアル内部の上部空間のガスを採取して GC/MS に導入し，分析を行った（日本電子製 JMS-Q1000GC)。同じ試料を専用の石英ガラス製試料管に高さ 6.0 cm になるよう充填し，ESR 分析（日本電子製 JES-FA100）を行った。
【結果および考察】GC/MS 分析により，米粉試料から合計 44 種類の揮発性香気物質が検出された。そこで粉砕直後から保管 28 日目までの試料のクロマトグラムのデータに基づいて主成分分析を行ったところ，日本米，タイ米とも粉砕後の日数が増加するにつれて第二主成分の値が増加することが分かった。主成分分析のローディングプロットを精査したところ，第二主成分を増加させる主要因物質として，①decanal，②2-ethyl-1-hexanol，③6-methyl-5-hepten-2-one，④tetradecane が見いだされた。これら 4 物質のクロマトグラムにおけるピーク面積値の総和の時間変化をプロットしてみると，日本米，タイ米ともに穀粒で保管して分析直前に粉砕した試料はほとんどピーク面積値の総和が変化しなかったのに対して，米粉保管試料は保管 28 日目に向かって増加傾向を示し，特にタイ米は直線的に増加していくことが分かった。着目した物質のうち，tetradecane 以外は，脂肪酸の酵素的酸化によって生成すると報告されている。そこで酸化過程で生成するラジカルを分析するため ESR 分析を行い，得られた各試料の ESR 信号強度変化を調べてみると，穀粒保管試料は期間全体を通じて一定の信号強度を維持しているのに対して，米粉試料は減少傾向を示した。さらに，米粉試料の着目成分のピーク面積値と ESR 相対信号強度との相関を調べたところ，両者には良好な相関がみられた。このことは米粉の品質変化にかかわる物質が脂肪酸の酸化由来であることを示唆している。また，ESR 分析が米粉の品質管理の指標になりうることを示している。

rice flour, volatile compound, electron spin resonance

発表責任者：山田昌治（yamadama@cc.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3B09a14
講演日時：3 月 17 日 11:43～ 共通講義棟南 B09 会場

大麦βアミラーゼは麦飯炊飯中に米粒内にも移行する

Translocation of barley b-amylase into rice grains during cooking Mugimeshi

○大倉 哲也[1]、佐野 杏奈[2]、露久保 美夏[2]、馬橋 由佳[2]、村上（山口） 友貴絵[3]、成田 宏史[4]、香西 みどり[2]([1]農研機構食研、[2]お茶大人間創成、[3]京都栄養医療専門校、[4]京都女子大食物)
○Tetsuya OOKURA[1], Anna SANO[2], Mika TSUYUKUBO[2], Yuka MABASHI[2], Yukie MURAKAMI-YAMAGUCHI[3], Hiroshi NARITA[4], Midori KASAI[2] ([1]NFRI, [2]Ochanomizu Univ., [3]Kyoto College of Nut. Med. Sci., [4]Kyoto Womens Univ.)

【目的】炊飯中の還元糖の増加は飯の食味に影響を与えるが、デンプン分解酵素の米（大麦）粒内の局在については不明な点が多い。演者らはこれまでコシヒカリや日本晴を用いてα及びβアミラーゼ、αグルコシダーゼについて、米粒内の局在や炊飯液への溶出について報告した[1)]。また米と大麦の混炊による麦飯では、米・大麦単独炊飯よりも還元糖量が増加すること[2)]、その機構解明として大麦のβアミラーゼが混炊中に炊飯液を経て米粒に入ること[3)]を明らかにしてきたが、米粒内の局在については明らかになっていない。本研究では、米と大麦の混炊における糖生成のメカニズム解明に重要な情報である大麦酵素の米粒内局在について明らかにすることを目的とした。そのためにβアミラーゼ活性がほとんどないと米の品種として日本晴を用い、大麦と混炊して米粒の蛍光免疫染色を行った。
【方法】試料としてH24年産滋賀県産日本晴（90%搗精）とH25年埼玉県産もっちりぼし（75%搗精丸麦；永倉精麦）を用い、混炊として等重量の米と大麦にそれぞれ1.5倍および1.8倍量の水を加え、混合して炊飯温度履歴で加熱し、20℃、40℃、60℃の時点でサンプリングを行った。米粒は４％パラホルムアルデヒドで固定して、川本法により凍結切片を作製し、βアミラーゼポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、オールインワン顕微鏡BZ-8000（キーエンス）にて観察し、得られた画像をphotoshopで加工した。
【結果】川本法により得られた凍結切片の厚さについて 5～10μm の範囲で検討した結果、適切な画像が得られたのは厚さ 5μm であった。米粒表面から長径方向に 25μm ごとに厚さ 5μm の切片を 1075μm まで作成して蛍光免疫染色を行い画像を観察した結果、もっとも明瞭だった 40℃時点のサンプルではβアミラーゼ由来の蛍光が表面から約 700μm 付近まで確認できた。米粒のサイズは長径 5.02±0.14mm、短径 2.87±0.12mm、厚さ 1.88±0.08mm であり、米粒中心部と表面の距離は約 900μm であることから米と大麦の混炊において大麦酵素が米粒内に浸入する際は米粒表面近傍にとどまらず中心部近くまで存在することが明らかになった。先に、混炊では大麦βアミラーゼに対するポリクロナール抗体により 55kD（βアミラーゼの分子量に相当）バンドが大麦および炊飯液だけでなく、米粒中にも 20℃と 40℃とで認められた[3)]が、免疫染色においてもβアミラーゼ抗体により米粒内部まで染色されたことから、大麦酵素が米粒内部で働いて炊飯による糖量増加に寄与する可能性が示された。

[1)] M. Tsuyukubo *et al., FSTR.* **16**, 523, 2010 [2)] 佐野杏奈ら日本調理学会誌 (印刷中)., [3)] .A. Sano *et al., FSTR* . **23**, 621, 2017

barley, b-amylase, Mugimeshi

発表責任者：大倉哲也（ookura@affrc.go.jp）

講演番号：3B09a15
講演日時：3 月 17 日 11:54～ 共通講義棟南 B09 会場

冷蔵保存中におけるデンプンの老化度の評価およびその抑制法

Evaluation of the degree of retrogradation of starch and its suppression during refrigerated storage

○大川 陽[1]、藤澤 望[1]、竹内 悠人[1]、脇 枝里子[2]、深石 光男[2]、秋間 彩香[3]、山口 勇将[1]、赤尾 真[1]、熊谷 日登美[1]、熊谷 仁[3] ([1]日大・生資科、[2]大塚薬品工業(株)、[3]共立女子・家政)
○Yo OKAWA[1], Nozomi FUJISAWA[1], Yuto TAKEUCHI[1], Eriko WAKI[2], Mitsuo FUKAISHI[2], Ayaka AKIMA[3], Yusuke YAMAGUCHI[1], Makoto AKAO[1], Hitomi KUMAGAI[1], Hitoshi KUMAGAI[3] ([1]Nihon Univ., [2]OHTSUKA-CI CO.,LTD., [3]Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】近年、様々な社会的背景の変化により、炊飯し冷蔵保存された米飯を食す機会が多くなってきているが、低温で長期間保存された米飯は、デンプンの結晶化（老化）のために硬くなる問題があり、保存中に老化を抑制する方法の確立が求められている。しかし、デンプンの老化度測定法自体が十分確立しているとはいえず、また、生デンプンの状態、炊飯条件や添加物が老化におよぼす影響は明らかではない。本研究では、米飯の老化の機構および老化抑制法を検討する前段階として、粉状デンプンを用いて、老化度の評価法および添加物が冷蔵保存中の老化度におよぼす影響に関して検討した。
【方法】粉状デンプンとしては、コーンスターチ（CS）を使用した。老化度の評価法としては、デンプンへの加水分解酵素の作用のしやすさから糊化度を算出する β-アミラーゼ・プルラナーゼ法（BAP 法）、および、結晶融解のエンタルピー変化（ΔH）から老化度を評価する示差走査熱量測定（DSC）を用いた。BAP 法による評価のための試料は、純水と CS を混合し、1～30%の CS 懸濁液を作製し、オートクレーブを用いて 121℃で 15 分加熱することにより得られた熱糊化 CS 溶液を用いた。得られた無添加および添加物を含む CS 溶液を 4℃で 1 日以上冷蔵保存し、BAP 法による測定に用いた。DSC 測定は、銀製 pan を用い、純水を入れた pan を reference として、昇温速度 1℃/min で行った。DSC 測定のための試料は、pan の内部で CS、純水、添加物を混合し 105℃まで昇温加熱して糊化させた後、室温まで冷却した pan を 4℃で冷蔵保存したものを用いた。糊化時の添加物としては酢酸を用いた。添加物の影響を検討する場合には、純水の代わりに添加物溶液と CS を混合し熱糊化を行った。
【結果】無添加の CS 溶液に関しては、数日の冷蔵保存により、BAP 法から求められる糊化度の低下、DSC から得られる結晶融解のエンタルピー変化 ΔH の上昇が確認された。このことからデンプンの老化度は、BAP 法により求められる糊化度、ΔH とのいずれを用いても評価しうることが示された。添加物の影響では、加熱糊化時に 0.1～2 M の酢酸を添加した 30%CS 溶液では、糊化度の低下は有意に抑制された。このことから、酢酸はデンプン溶液の老化の進行を抑制することが示された。今後、CS 以外のデンプン、酢酸以外の添加物が老化におよぼす影響についても検討を加えて発表を行う予定である。

Starch retrogradation, Beta-amylase-Pullulanase (BAP) method, Differential Scanning Calorimetry (DSC)

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B09p01
講演日時：3 月 17 日 14:00～ 共通講義棟南 B09 会場

精製コンニャクグルコマンナンゾルのアセチル化度が冷凍劣化に及ぼす影響

Effects of konjac glucomannan with different degree of acetylation on deterioration of its frozen sol

○宝門 祐樹、勝野 那嘉子、西津 貴久（岐阜大院）
○Yuuki HOUMON, Nakako KUTSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】コンニャクゲルは，冷解凍により組織がスポンジ状となり食感が著しく低下するという冷凍障害が生じる。当研究室では，コンニャクゾルのアルカリ処理による pH の増加が冷凍物性の変化に及ぼす影響について検討してきた。これまでの研究から，コンニャク精粉を用いたコンニャクゾルでは，pH の増加に伴いアセチル化度(DA)が減少して冷解凍後の物性劣化の程度が大きくなること，そしてコンニャクゲルが冷凍耐性を持つ限界の DA は 0.985 %付近であることを明らかにした。本研究では，コンニャク精粉より不純物が少ない，アルコール精製コンニャクグルコマンナン(KGM)を用い，DA を変えて作ったコンニャクゲルの冷凍による物性及び構造変化の測定を行い，冷凍耐性を保つ限界 DA を探索した。

【方法】アルコール精製 KGM(清水化学製，プロポール A，平均分子量 1.36×10^6) 10 g に対して水 350 g 加え，5 分間撹拌・脱泡して室温で 1 時間膨潤させたものをコンニャクゾルとした。NaOH 水溶液をコンニャクゾルに添加し pH を 12 段階に調製し，よく混捏したものを成型し，22 分間加熱した後に放冷した。冷凍サンプルは，－20℃で 24 時間冷凍後，水道水中に 1 時間，室温に 1 時間放置して解凍した。脱アセチル化度(DD)，結晶性，離水率，破断特性，構造をそれぞれ，FT-IR 及び Eberstad 法，X 線回折法(Cu-Kα線)，遠心分離，貫入試験，位相差顕微鏡観察により評価した。

【結果・考察】アルコール精製 KGM の DA は 3.12 %であり，コンニャクゾルの pH が高くなるほど DA は減少し， pH10.34 においてほぼ 0 %となった。DA を小さくするほど，加熱後のゲルの貫入抵抗は増加し，また位相差顕微鏡観察から KGM のネットワーク構造がより緻密になった。いずれも，DA=0.033 %で貫入抵抗が最大に，そして構造が最も緻密になった。DA を 1.15 %にすると， KGM ネットワーク構造は，冷解凍前よりも構造体が太くなり，疎な構造となった。DA=0.672 %以上の試料では，冷解凍前後で貫入抵抗に変化は見られなかったが，DA=0.265 %以下になると冷凍により貫入抵抗と離水率が増加した。また，DA の減少に伴い X 線回折ピークが 2θ=19.6°，20.6°で生じるとともに，冷解凍処理により X 線回折ピークが 2θ=19.6°以外に，2θ=10.5°，22.1°で生じた。以上の結果から，アルコール精製された KGM を用いたコンニャクゲルが冷凍耐性を保つ限界 DA は，0.672 %付近であることが示唆された。

konjac, freezing, degree of acetylation

講演番号：3B09p02
講演日時：3 月 17 日 14:11～ 共通講義棟南 B09 会場

クリの低温貯蔵による栗きんとんの物性変化
Changes in physical properties of *kurikinton* by low temperature storage of chestnuts
○町田 有紀[1]、勝野 那嘉子[1]、水谷 恵梨[2]、西津 貴久[1]、加島 隆洋[2]([1]岐阜大学、[2]岐阜県産業技術センター)
○ Yuki MACHIDA[1], Nakako KATSUNO[1], Eri MIZUTANI[2], Takahisa NISHIZU[1], Takahiro KASHIMA[2] ([1]Gifu Univ., [2]Industrial Technology Center Gifu Prefectural Government)

【目的】
栗きんとんは蒸したクリを裏ごしし, 茶巾で絞った素朴な和菓子である。原料であるクリは収穫期に比べ需要期が長いため, 収穫後は使用時まで低温貯蔵される。クリを低温貯蔵するとスクロースが増加することが報告されているが [1)], 低温貯蔵と栗きんとんの物性やでんぷんの老化特性との関係は不明である。そこで, 本研究では低温貯蔵が栗きんとんの物性やでんぷんの老化特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】
試料は岐阜県中山間農研中津川支所で栽培した２Ｌサイズのクリ（品種：筑波）を用いた。低温貯蔵は２℃で１,15,29 日間行った。貯蔵後は 98℃で 15 分間蒸し,果肉部分を取り出し細片化した。その後、ラップで絞り栗きんとんを作製した。作製した栗きんとんは 5℃で０,１,３日間冷蔵保存し,でんぷんの老化を全自動多目的 X 線回折装置（ブルガー・エイエックスエス株式会社 BRUKER ADVANCED X-RAY SOLUTIONS D8 ADVANCE）によって評価した。なお,老化度は 17° のピーク面積で評価した。栗きんとんの動的粘弾性は,レオメーター（TAinstruments AR-G2 KG）によって測定した。2ｇのサンプルをステージに載せ,コーンプレート型のジオメトリーを用い, 20℃で周波数スイープ測定（周波数 0.1Hz～10.00Hz）を行った。栗きんとんの付着性は,テクスチャーアナライザー（英弘精機株式会社 TA.XT.plus）により円筒型プランジャーを用いて測定した。
【結果】
X 線回折では冷蔵保存日数が長くなるにつれてでんぷんの老化を示す 17° のピーク面積が有意に増加した。しかし,低温貯蔵日数の違いによる比較では 17° のピーク面積に有意差は認められなかった。一方,動的粘弾性測定の結果から,低温貯蔵日数が長くなるにつれて,*G', G"*ともに有意に低下することが明らかとなった。また,付着性測定では,低温貯蔵日数が長くなるにつれて,付着性が有意に増加した。したがって,クリを低温貯蔵することによる老化抑制効果は認められなかったが,低温貯蔵することで,栗きんとんは柔らかく,付着性が高くなることが示唆された。

（1　加島ら，岐阜県産業技術センター研究報告　No.10　p39～41（2016）

chestnuts, low temperature storage, physical properties

講演番号：3B09p03
講演日時：3 月 17 日 14:22～ 共通講義棟南 B09 会場

クッキー保管中の割れに関する研究

Study on cracks occurred in cookies during their storage

○長谷川 紘平[1]、中原 仁[2]、岩朝 義弘[2]、川口 智治[2]、西津 貴久[1]([1]岐阜大学、[2]森永製菓株式会社)
○ Kohei HASEGAWA[1], Hitoshi NAKAHARA[2], Yoshihiro IWASA[2], Tomoharu KAWAGUCHI[2], Takahisa NISHIZU[1] ([1]Gifu Univ., [2]Morinaga & CO.,LTD.)

【目的】
クッキーは，焼成後，数日経過してから割れることがある。割れの頻度は気温や湿度の影響を受けることが経験的に知られているが，その関係について詳細に検討されていないのが現状である。そこで本研究では，雰囲気温度と湿度がクッキーの割れ率に及ぼす影響を実験的に検証するとともに，焼成後の放冷期間でのクッキーの硬化温度，硬化による体積の収縮率の観点から，割れの挙動を解明することを目的とした。
【方法】
実験 1：外径 54 mm，厚さ 9 mm の市販クッキーを一定の温度(25 ℃，40 ℃，55 ℃，70 ℃)，湿度(25 %，50 %，75 %)のもとに保管し，クッキーの割れ枚数の経時変化を調査した。
実験 2：焼成後のクッキーについて放冷期間中のクッキー内部の水分および温度変化を測定した。焼成後適当な時間間隔でサンプリングし，コルクボーラーで中心部(直径 15 mm)，中心部を除くその周囲(直径 35 mm)，外縁の 3 区分に分け，絶乾法により部位別の水分を測定した。クッキーの中心部を割断し，その断面をサーモカメラで撮像し，クッキー内の温度分布の経時変化を測定した。DMA（動的粘弾性測定装置）を用いて，放冷後のクッキーを 3 ℃/min で昇温した時の歪変化を測定し，その変曲点からクッキーの軟化温度を決定した。
【結果】
雰囲気温度と湿度が一定の条件下で保管したクッキーは，高温高湿条件下で割れ率が高い傾向があった。焼成直後のクッキー中心部の水分は外縁部より約 1 %大きく，外縁部に向かうほど減少するが，放冷後，徐々に水分勾配は減少し，焼成 7 日後には中心部と外縁で約 0.2%の差にまで減少した。内部温度は表面付近および厚さの薄くなる外縁部の温度減少速度が中心部よりも大きいことが確認できた。またクッキーの軟化温度は 50 ℃から 60 ℃の範囲にあり，低水分ほど高くなったことから，焼成後の放冷時には逆に低水分の領域から硬化すると推察される。以上のことから，放冷時に表層および外縁部が中心部よりも先に硬化し，その後，中心部が温度低下により収縮する際，すでに硬化した領域との間に残留応力が生じ，その部分が衝撃や温湿度変化による軟化により割れるものと推察される。

cookie, crack, softening temperature

講演番号：3B09p04
講演日時：3 月 17 日 14:33～ 共通講義棟南 B09 会場

リン含量の異なる馬鈴薯澱粉の酵素分解性に及ぼす多糖類の影響
Effect of non-starch polysaccharides on the in vitro starch digestibility of potato starch with varying phosphorus content
○佐々木 朋子（農研機構）
○Tomoko Sasaki (NARO)

【目的】糖尿病の患者数が年々増加しているため、食後血糖値の上昇抑制効果を期待して、緩やかに消化される澱粉素材および澱粉系食品の開発がもとめられている。そこで本研究では、加工食品において澱粉と共に使用されることが多い非澱粉性多糖類が示す澱粉の酵素分解性に対する遅延作用に着目し、リン含量の異なる馬鈴薯澱粉と電荷の異なる多糖類を組み合わせて、澱粉の酵素分解性に及ぼす影響を解析した。
【方法】リン含量の異なる 6 品種の馬鈴薯から澱粉を精製し、電荷の異なる 3 種の多糖類（キサンタンガム、グアガム、キトサン）を各々混合した澱粉懸濁液と糊化液を調製して試料とした。これらの試料を用いて人工消化液を作用させた後、澱粉糊化液については 10、20、60、120 分後、澱粉懸濁液については 20、60、120、180、240、300 分後に遊離グルコース量の定量を行い、澱粉消化性の評価を行った。また、6 品種の馬鈴薯澱粉についてはリン、ナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウムの定量を行い、澱粉消化性との関連性を解析した。各種多糖類を添加した馬鈴薯澱粉の加熱および冷却時の粘度特性の変化をラピッドビスコアナライザー(RVA) を用いて測定した。
【結果】生澱粉に各種多糖類を添加した懸濁液については、消化酵素による澱粉分解率は馬鈴薯の品種間および添加した多糖類の種類によって顕著な差が認められた。いずれの多糖類も澱粉の酵素分解性に対して抑制効果を示したが、抑制効果はキサンタンガムが最も高く、次いで、キトサン、グアガムの順序であった。多糖類を添加した混合系においても澱粉の酵素分解性は馬鈴薯の品種間差がそのまま反映されており、低リン含量の品種が最も高い澱粉分解率を示した。多糖類を添加した馬鈴薯糊化澱粉については、消化速度が極めて速く、生澱粉に比べて澱粉分解率の品種間差は小さかったが、生澱粉と同様に 3 種類の多糖類の澱粉酵素分解性に対する抑制効果が確認された。抑制効果はキサンタンガムが最も高く、次いでグアガム、キトサンの順序であった。各反応時間の澱粉分解率とリン、ナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム含量およびイオン当量との間に有意な相関性は認められなかった。一方、各試料の澱粉分解率と RVA による粘度測定で得られた各種パラメータとの関連性を解析した結果、キサンタンガム添加群を除いては、生澱粉の澱粉分解率と RVA のパラメータとの間に有意な相関性が認められた。

starch digestibility, potato starch, polysaccharides

講演番号：3B09p05
講演日時：3 月 17 日 14:44～ 共通講義棟南 B09 会場

Effect of different humidities on the release rate constant of 1-methylcyclopropene coated paper

○HERMAWAN DWI ARIYANTO[1], HIDEFUMI YOSHII[2] ([1]Department of Applied Bioresource Science, Ehime University, [2]Department of Applied Biological Science, Kagawa University)

【Purpose】 The additional function of fruit and vegetable packaging containing 1-methylcyclopropene (1-MCP) active agent have more gained attention in the past years. 1-MCP is widely used to inhibit the ethylene action during postharvest processing of fruits and vegetables by binding the ethylene receptor. Controlled release packaging with 1-MCP as active compound is an alternative method to extend the shelf life of fruits and vegetables. Environmental factors such as humidity and temperature have impacted on the release of 1-MCP from the polymer-coated inclusion complex powder of 1-MCP. This research focused on release kinetics mechanism of 1-methylcyclopropene from coated paper in various conditions. 1-MCP release behaviour was investigated by dynamic sorption system (DVS) at a stepwise humidity change.

【Materials and Methods】 Initially, 1-MCP gas was obtained with synthesis reaction between 25 g of phenyllithium solution in dibutyl ether and 5.9 mL of 3-chloro-methylpropene. The formation of 1-MCP inclusion complex with α-cyclodextrin (α-CD) (Cyclochem Co., Ltd. Kobe, Japan) as wall material was produced at the laboratory by followed previous research with minor modifications. The formation of 1-MCP coating paper was produced by mixing 1-MCP inclusion complex with polymer as a coating material then coated onto paper. 1-MCP release experiments from paper were investigated using DVS at different temperatures (40, 50, and 60 ^{o}C) with the stepwise humidity changes (20 %RH for 2 h to 40, 50, 60, and 80 %RH for 2 h respectively). The release of 1-MCP from coating paper under linearly ramped humidity was monitored by A Shimadzu GC-14B gas chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

【Results and Discussion】 During exposure at 20 %RH, the release rate of 1-MCP from coated paper was constant. At step humidity change from 20 %RH to 40, 50, and 60 %RH resulted the almost same release rate constants of 1-MCP. However, at a step humidity change from 20 %RH to 80 %RH, the release rate of 1-MCP from coated paper significantly increased until reach the maximum flux and then decreased gradually. This decreasing, may possibly be caused by the collapse of the particles which were aggregated at higher RH. Release rate constant of 1-MCP could be correlated with moisture concentration.

1-MCP, Release rate, Inclusion complex

発表責任者：YOSHII HIDEFUMI（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3B09p06
講演日時：3 月 17 日 15:05～ 共通講義棟南 B09 会場

亜臨界水中でのグルコース濃度が異性化反応に及ぼす影響

Effect of Glucose concentration on the isomerization in subcritical water

○平山 祐輔[1]、小林 敬[2]、谷 史人[2] ([1]京大農、[2]京大院農)
○Yusuke HIRAYAMA[1], Takashi KOBAYASHI[2], Fumito TANI[2] ([1]Fac. Agric, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric, Kyoto Univ.)

【背景】亜臨界水中では、グルコースの分解反応やフルクトースへの異性化が進行する。亜臨界水中での糖の反応挙動は、従来、1%以下の低濃度の原料を用いて解析されてきたが、高濃度の糖存在下での挙動についてはほとんど解析されてこなかった。また、これまでの亜臨界水処理によるグルコースの反応において、反応の進行に伴いグルコースの分解が遅くなり、一次反応では表現できないことが報告されているが、その原因は明らかにはされていない。そこで本研究では、グルコースを亜臨界水処理し、グルコースの初濃度が分解挙動に及ぼす影響を速度解析し、反応次数に及ぼす因子を探索した。
【方法】0.1~40%（w/w）のグルコース水溶液をステンレス製流通式反応器に通液し、200℃で亜臨界水処理を実施した。いくつかの滞留時間を設定し、得られた反応液の原料糖及び生成物の濃度を HPLC にて定量するとともに、反応液の pH を測定した。
【結果・考察】グルコース残存率から判断すると、低濃度（0.5%以下）及び高濃度（20%以上）のグルコース水溶液を用いた場合、反応は速く進行したが、中間の濃度（5%付近）では反応の進行が遅かった（滞留時間 400 秒に設定したとき、グルコース初濃度 0.1%でグルコース残存率 66%；初濃度 5%で残存率 81%；初濃度 40%で残存率 67%）。また、各条件におけるグルコースの分解反応を速度解析した。その結果、反応の初期は一次反応に従ったが、反応の後期は一次反応では表現できず、Weibull 式を適用すると反応全体を表現できた。Weibull モデルにおける反応速度定数を計算したところ、グルコースの初濃度が中間の濃度のときの反応速度定数に比べ、低濃度と高濃度では大きな値をとった。

反応の進行に伴い、フルクトースの生成が確認され、その収率は、滞留時間の増加に伴い増加したが、グルコース初濃度の増加に従って収率は減少した。フルクトースの選択率は、グルコースの初濃度にかかわらず、滞留時間の増加に従って減少した。これは、グルコースの分解に伴って多くの副生成物が生じたためだと考えられる。反応液の pH は、滞留時間の増加及びグルコース初濃度の増加に従って低下した。高濃度のグルコース水溶液を用いた場合、滞留時間 10 秒の時点で大きく pH が低下した。また、グルコースの初濃度にかかわらず、反応後期では pH の低下は緩やかになった。フルクトースの選択率を pH に対してプロットしたところ、低い pH では選択率が減少し、7%以下に収束した。

glucose isomerization, subcritical water, kinetics

講演番号：3B09p07
講演日時：3 月 17 日 15:16～ 共通講義棟南 B09 会場

プロテオグリカンを用いた妙丹柿の渋戻り抑制加工法の検討

Development of inhibitory method for astringency recurrence using proteoglycan in astringent persimmon.

○田中 早紀、山本 歩（八戸高専）
○Saki TANAKA, Ayumi YAMAMOTO (NIT, Hachinohe College)

【目的】

妙丹柿（*Diospyros kaki* Thunb）は、青森県南部地方で 250 年前から栽培されている。妙丹柿は渋柿であり、脱渋後に加熱することで渋みが再発することから（渋戻り）、現状として脱渋して生で食すか干し柿や柿酢としての加工することが主な利用方法である。従来、渋戻り抑制方法として大豆タンパク質などを用いる方法が考えられている。しかし、大豆タンパク質を使用すると、柿の有効成分である柿ポリフェノールが除去されてしまうことや大豆特有の風味が残ってしまう等の課題がある。そこで本研究では、青森県発の機能性素材であるサケ鼻軟骨から抽出されたプロテオグリカンを用いる渋戻り抑制加工法の検討を試みた。

【方法】

ペースト状にした妙丹柿に、大豆粉、コラーゲンペプチド（イズミダイ鱗抽出物）、プロテオグリカン（サケ鼻軟骨抽出物）を 0、1、3、5%の濃度で添加し、80℃の熱水で 3 時間加熱した。加熱処理後の柿ペーストを遠心分離（10,000 rpm、60 min）し、上清（柿エキス）を得た。柿エキスに含まれる糖度（糖度計）、ポリフェノール量（フォーリンチオカルト法）、全糖量（フェノール硫酸法）を測定した。また、官能検査（5 名による単純盲検法）により各柿エキスの渋味、甘味の比較を行った。

【結果】

全糖量、糖度はともにプロテオグリカン 5%添加サンプルが他サンプルに比べて高い値を示した。また、柿エキス中のポリフェノール含量はプロテオグリカン添加サンプルで未処理サンプルより増加することが確認された。また、柿エキスの回収率はプロテオグリカンを処理したサンプルが最も高い結果となった。官能検査ではプロテオグリカン処理によって得られた柿エキスが甘味を最も強く感じ、かつ渋味が弱く、美味しいという評価であった。以上の結果より、プロテオグリカンを用いることで機能性が期待される柿ポリフェノールを失わずに渋戻り抑制ができる可能性が示唆された。

本研究は、あおもり元気企業チャレンジ助成事業を活用して実施した。

Persimmon (Diospyros kaki Thunb), Proteoglycan, Astringency recurrence

発表責任者：山本歩（yamamoto-c@hachinohe-ct.ac.jp）

講演番号：3B09p08
講演日時：3 月 17 日 15:27～ 共通講義棟南 B09 会場

北海道産小豆粉の製造方法と利用に関する研究

Study on powder milling method and use of the adzuki bean from Hokkaido

○渡辺 治（道総研食加研）
○Osamu WATANABE (Hokkaido Food Processing Research Center)

【背景・目的】

小豆は北海道が国内生産の約 90%を占める重要な作物である。しかし、その主な用途である餡製品の消費の低迷や輸入餡の影響でその生産量は減少しており、産地、関連業界などから小豆の需要拡大が強く要望されている。そこで、本研究では、餡以外の用途として、製菓・製パンで活用可能な小豆粉の製造と、それを活用した食品製造技術の開発を行った。また、民間企業と連携し、小豆粉の生産、流通、利用に至る一連の流れの試作・実証試験を行い、新たな需要創出を目指した。

【方法・結果】

小豆をピンミルとボールミルを用いて製粉し、得られた小豆粉の粒度分布と糊化特性について評価するとともに、パンやスポンジケーキ等を試作し比容積などの物性測定と 15 名のパネラーによる官能評価を行った。その結果、粒度区分によって成分組成が大きく異なること、「小豆外皮、あん粒子、微粉」各々の増大が「膨らみ」を阻害することがわかった。また、分級および粉砕の調整により、「膨らみ」を阻害する因子の除去が可能であることを明らかにするとともに、粉砕、分級および混合操作の組み合わせによる小豆粉製造法（二段階製粉法）を構築した。ピンミルのみで製粉した小豆粉（A）と二段階製粉法で製粉した小豆粉（B）、それぞれを用いた試作品の官能評価および物性評価を行った結果、小豆粉（B）は小豆粉（A）と比べて製パン適性が改善され、風味や食感の評価が高かった。またスポンジケーキでは、小麦粉を小豆粉で 100%置き換えることが可能であったほか、小豆粉（B）が小豆粉（A）の粉と比べて食感や香りの点で評価が高く、また膨らみが改善されるなど、高い加工適性を持つことが明らかになった。以上より、パンおよびスポンジケーキなど、製菓・製パン用途別に必要な小豆粉の加工適性を明らかにした。次に、得られた知見を活用し、道内企業と連携した試作・実証試験を行い、実用化に向けた意見を集約した。その結果、今回開発した小豆粉は多くの菓子製品に利用できるとの評価結果が得られ、実用性が高いことが明らかなった。今後は、食品ごとに求められる小豆粉の特性が異なると考えられることから、実需者評価で得られた企業ニーズをもとに、用途別小豆粉の規格化と製造方法を確立していく。

adzuki bean powder, milling, powder characteristics

発表責任者：渡辺治（watanabe-osamu@hro.or.jp）

講演番号：3B09p09
講演日時：3 月 17 日 15:38～ 共通講義棟南 B09 会場

イオン性及び非イオン性界面活性剤を用いた大豆油の乳化における粒子径分布の温度依存性

Temperature effect on the diameter distributions of the oil droplets in O/W type emulsions prepared with ionic and non-ionic surfactants

内河 聡太郎、○島 元啓（石川県立大学）
Soutaro UCHIKAWA, ○Motohiro SHIMA (Ishikawa Pref. Univ.)

ポリオキシエチレンなどを親水基とする非イオン性界面活性剤は温度の上昇により親水基の水素結合が弱まり、疎水性が高くなることが知られている。そのため、親水基の多い界面活性剤であっても、親水性疎水性バランス（HLB）が低下して、疎水性が増加した界面活性剤へと変化する。そこで本研究では、乳化過程における温度の制御が生じたエマルションの粒子径分布に及ぼす影響を測定した。併せて、界面活性剤の親水基の違いが及ぼす影響も調べた。

イオン性界面活性剤として SDS、非イオン性界面活性剤として Tween 20 を用いて、大豆油を乳化する際の粒子径分布の温度依存性を 30～69℃の範囲で検討した。乳化はロータ・ステータ型ホモジナイザを用いて行った。実験の結果、SDS と Tween 20 の両方において、温度の上昇とともに粒子径分布が増加する傾向が見られた。ただし、増加傾向は界面活性剤の種類によって異なり、SDS を界面活性剤として用いた場合は最小粒子径にあまり変化がなく、最大粒子径が減少する傾向を示し、全体として温度の上昇によって粒子径分布が減少する傾向が観察された。一方、Tween 20 を界面活性剤として用いた場合は、粒子径分布はあまり変化せず、全体として粒子径が小さくなる傾向が観察された。

本研究の結果から、非イオン性界面活性剤と同様に、イオン性界面活性剤においても乳化温度の上昇とともに粒子径が小さくなる傾向が観察されたが、その分布の形状は二つの界面活性剤の間で違いが見られることが明らかになった。

emulsification, hydrophile-lipophile balance, distribution of droplet diameters

発表責任者：島 元啓（shima@ishikawa-pu.ac.jp）

シンポジウムプログラム

3月18日（日）9:00〜12:00

4SY01　皆に知って欲しい（意外と知らない）酵素の産業利用〜その3〜

協　賛：酵素工学研究会
3月18日（日）9:00〜12:00　B02会場（共通講義棟南　1階　S102）
世話人：廣瀬芳彦（エンザイム テクノ），上田　誠（小山高専物質工学科），髙木　忍（ノボザイムズ ジャパン）
座　長：廣瀬芳彦（エンザイム テクノ），上田　誠（小山高専物質工学科），髙木　忍（ノボザイムズ ジャパン）

9:00		はじめに	廣瀬芳彦（エンザイム テクノ）
9:05	4SY01-1	血糖測定用酵素の開発動向	○岸本高英（東洋紡　敦賀バイオ研）
9:35	4SY01-2	酵素による希少糖の製造とその産業利用	○新谷知也（松谷化学工業株式会社）
10:05	4SY01-3	植物油製造における酵素利用	○眞野弘範（ノボザイムズ ジャパン株式会社）
10:35	4SY01-4	バイオレメディエーション；土壌汚染を自然の浄化作用で解決	○川原恵一郎（株式会社アース・ソリューション）
11:05	4SY01-5	ベストサイエンスが産業を生む	○栗木　隆（江崎グリコ株式会社）
11:35		おわりに	上田　誠（小山高専物質工学科）

4SY02　多様な抗菌ペプチドが導く新たな研究領域の展開

3月18日（日）　9:00〜12:00　B03会場（共通講義棟南　1階　S103）
世話人：園元謙二（九大院農），田口精一（東農大生命）
座　長：園元謙二（九大院農），田口精一（東農大生命）

9:00		はじめに	園元謙二（九大院農）
9:05	4SY02-1	多様な乳酸菌抗菌ペプチドの探索とその可能性	○善藤威史，園元謙二（九大院・農）
9:40	4SY02-2	遺伝子組換え抗菌ペプチドの高効率生産技術とその応用	○相沢智康（北大先端生命）
10:15	4SY02-3	昆虫由来抗菌ペプチドの応用に関する研究	○石橋　純（農研機構）
10:50	4SY02-4	納豆抽出抗菌ペプチドの抗がん剤への応用	○伊藤英晃（秋田大院理工）
11:25		おわりに	田口精一（東農大生命）

4SY03　食の代謝・進化から迫る生命の戦略

3月18日（日）　9:00〜11:50　B04会場（共通講義棟南　2階　S201）
世話人：小田裕昭（名大院生命農），武村政春（東京理大理）
座　長：小田裕昭（名大院生命農），武村政春（東京理大理）

9:00		はじめに	小田裕昭（名大院生命農）
9:05	4SY03-1	栄養素の起源　ー栄養素はいつ生まれ，どう進化したかー	○小田裕昭（名大院生命農）
9:35	4SY03-2	タンパク質必要量とその認識機構	○金本龍平（京大院農）
10:05	4SY03-3	エネルギー欠乏への対応戦略	○矢作直也（筑波大医）
10:35	4SY03-4	進化から学ぶインスリン様成長因子／インスリンシステムの生理的意義	○高橋伸一郎（東大院農生科）
11:05	4SY03-5	巨大ウイルスの“食”　〜宿主との相互作用を通じた独自戦略〜	○武村政春（東京理大理）
11:35		総合討論	武村政春（東京理大理）

4SY04　コムギタンパク質の食品科学研究最前線

共　催：日本学術会議農芸化学分科会
3 月 18 日（日）　9:00～11:50　B05 会場（共通講義棟南　2 階　S202）
世話人：裏出令子（京大院農），熊谷日登美（日大生資科）
座　長：熊谷　仁（共立女子家政），裏出令子（京大院農），松田　幹（名大院生命農），熊谷日登美（日大生資科）

9:00　はじめに……藤原葉子[1,2]（[1]お茶大基幹研究院，[2]お茶大 HLI 研）
9:05　4SY04–1　グルテニン遺伝子型の情報を利用した加工適性の優れる小麦品種の育成
……○伊藤美環子，寺沢洋平，長澤幸一，八田浩一（農研機構 北海道農業研究センター）
9:35　4SY04–2　小麦粉生地物性とグルテニンマクロポリマーについて……○野崎聡美（㈱日清製粉グループ本社）
10:05　4SY04–3　グリアジン凝集体のナノ構造と物性……○裏出令子[1]，佐藤信浩[2]，杉山正明[2]（[1]京大院農，[2]京大原子炉）
10:35　休憩
10:45　4SY04–4　小麦タンパク質の抗肝炎・抗炎症作用……○江頭祐嘉合（千葉大院・園芸）
11:15　4SY04–5　脱アミド化が小麦タンパク質の特性およびアレルゲン性に及ぼす影響……○熊谷日登美（日大生資科）
11:45　おわりに……熊谷日登美（日大生資科）

4SY05　ヒトの健康増進に利用可能な糖質を介したヒト―微生物間の相互作用

3 月 18 日（日）　9:00～12:00　B06 会場（共通講義棟南　2 階　S203）
世話人：竹川　薫（九大院・農），片山高嶺（京大院・生命）
座　長：竹川　薫（九大院・農），片山高嶺（京大院・生命）

9:00　はじめに……竹川　薫（九大院・農）
9:05　4SY05–1　糖鎖や糖類を介した微生物と高等動物の相互作用……○竹川　薫（九大院・農）
9:35　4SY05–2　酢酸菌の生産する希少糖類の利用……○竹下　圭（株式会社伏見製薬所）
10:10　4SY05–3　食品の新しい機能性素材としての LPS（リポポリサッカライド）の有用性
……○稲川裕之[1,2,3]（[1]香川大医，[2]新潟薬科大，[3]自然免疫技組）
10:45　4SY05–4　機能性オリゴ糖の創出を目指したオリゴ糖ライブラリーの構築……○中井博之（新潟大農）
11:20　4SY05–5　母乳成分を介したビフィズス菌とヒトの共生・共進化―母乳オリゴ糖と HYA 仮説―
……○片山高嶺[1]，後藤愛那[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]（[1]京大院・生命，[2]京大院農）
11:55　おわりに……片山高嶺（京大院・生命）

4SY06　新局面に突入する消化管研究―オルガノイド培養系から見えてくるもの

3 月 18 日（日）　9:00～12:00　B07 会場（共通講義棟南　3 階　S301）
世話人：岩槻　健（東農大応生），清水　誠（東農大応生）
座　長：岩槻　健（東農大応生），清水　誠（東農大応生）

9:00　はじめに……岩槻　健（東農大応生）
9:05　4SY06–1　オルガノイドが切り拓く疾患生物学
……○佐藤俊朗，股野麻未，太田悠木，高野　愛，下川真理子（慶大医）
9:45　4SY06–2　腸管オルガノイドを用いた microRNA の解析……○園山　慶（北大院農）
10:05　4SY06–3　腸管オルガノイドの幹細胞機能に対する食品関連成分の影響
……○服部一夫，齋藤由季，羽生ひかる（東京農大応生）
10:25　4SY06–4　Enteroid を用いた Paneth 細胞が制御する腸内環境の機能解明
……○中村公則，横井友樹，米田　司，綾部時芳（北大先端生命）
10:45　4SY06–5　霊長類の味蕾オルガノイドの作製とその解析……○岩槻　健（東農大）
11:05　4SY06–6　次世代オルガノイド研究の展望……○武部貴則[1,2]（[1]横浜市大医，[2]シンシナティ小児病院）
11:45　おわりに……清水　誠（東農大応生）

4SY07　寿命・老化の理解に迫る実験系と方法論

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　B08 会場（共通講義棟南　3 階　S302）
世話人：饗場浩文（名大・創薬），川向　誠（島根大・生物資源），水沼正樹（広島大・先端物質）
座　長：饗場浩文（名大・創薬），川向　誠（島根大・生物資源），水沼正樹（広島大・先端物質）

9:00　はじめに……饗場浩文（名大・創薬）
9:05　4SY07–1　分裂酵母の経時寿命を延ばす遺伝子と変異株の解析……○饗場浩文（名古屋大・創薬）
9:30　4SY07–2　メチオニン代謝産物による寿命延長機構……○水沼正樹（広島大・院先端研）
9:55　4SY07–3　哺乳動物における視床下部神経を介した睡眠・老化・個体寿命の制御機構
……○佐藤亜希子（長寿研中枢性老化・睡眠制御 PT）
10:25　4SY07–4　**NAD** 代謝による老化制御機構……○中川　崇（富山大医）
10:55　4SY07–5　コエンザイム **Q10** と老化……○川向　誠（島根大生資）
11:20　4SY07–6　血液と分裂酵母で共通する代謝物……○柳田充弘（沖縄科学技術大学院大学）
11:55　おわりに……川向　誠（島根大・生物資源）

4SY08　美味しさを科学する新潮流

3 月 18 日（日） 9:00～11:40　A01 会場（共通講義棟北　1 階　N102）
世話人：平田　大（朝日酒造㈱・広島大），藤井　力（酒総研），伏木　亨（龍谷大）
座　長：平田　大（朝日酒造㈱・広島大），藤井　力（酒総研），伏木　亨（龍谷大）

9:00　はじめに……平田　大（朝日酒造・広島大）
9:05　4SY08–1　新規評価系を用いた美味しさの評価……○中野久美子（甲子園短大，龍谷大）
9:30　4SY08–2　「清酒」の肴とのおいしさ～新評価法の適用～……○中村　諒（朝日酒造㈱，龍谷大）
9:55　4SY08–3　ワインと清酒の食品との組み合わせによる香味変化……○藤田晃子（酒類総研）
10:20　4SY08–4　コーヒーの美味しさについて……○旦部幸博（滋賀医大医）
10:45　4SY08–5　和食のだしの美味しさの鍵となる香気成分……○網塚貴彦（長谷川香料㈱総合研究所）
11:10　4SY08–6　「和食」の美味しさについて……○高橋拓児（木乃婦）
11:35　おわりに……伏木　亨（龍谷大）

4SY09　消化管と脳・神経系を結ぶ食品因子研究の新機軸

共　催：SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」
後　援：日本フードファクター学会
3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A02 会場（共通講義棟北　1 階　N103）
世話人：越阪部奈緒美（芝浦工大・生命），下位香代子（静岡県大・環境生命）
座　長：越阪部奈緒美（芝浦工大・生命），下位香代子（静岡県大・環境生命）

9:00　はじめに……下位香代子（静岡県大・環境生命）
9:15　4SY09–1　生体イメージングによる食シグナルの可視化解析……○安達貴弘（東京医科歯科大学）
9:45　4SY09–2　脂肪酸受容体と栄養－神経－エネルギー代謝制御……○木村郁夫（東京農工大農）
10:15　4SY09–3　ラット母子分離ストレスモデルにおけるストレス関連行動と腸内細菌の相関
……○内藤裕二，村上貴彬，鎌田和浩（京都府立医科大学消化器内科）
10:45　4SY09–4　玄米機能成分を活かした脳機能改善と生活習慣病予防のアプローチ
……○益崎裕章，小塚智沙代，與那嶺正人，岡本士毅（琉球大学）
11:15　4SY09–5　難吸収性ポリフェノールの消化管センシングを介した作用メカニズムの解明
……○越阪部奈緒美（芝浦工大・生命）
11:45　おわりに……越阪部奈緒美（芝浦工大・生命）

4SY10　鳥類の農芸化学 － 基礎研究から産業利用まで

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A03 会場（共通講義棟北　1 階　N104）
世話人：奥村裕紀（名城大農），石川伸一（宮城大食産業）
座　長：奥村裕紀（名城大農），石川伸一（宮城大食産業）

9:00　4SY10–1　はじめに～鳥類卵膜の構造と生理機能の分子基盤……○奥村裕紀（名城大農）
9:30　4SY10–2　鳥類の輸卵管における精子貯蔵機構とその応用……○笹浪知宏（静岡大農）
10:00　4SY10–3　生殖細胞の凍結・移植による家禽遺伝資源の長期保存……○中村隼明（広島大生物圏科学）
10:30　4SY10–4　比較生物学と異分野融合研究による季節適応機構の理解とその制御
……○吉村　崇[1,2,3]（[1]名大 ITbM，[2]名大院生命農学，[3]基生研）
11:00　4SY10–5　鳥類における遺伝子操作……○水島秀成（北大理）
11:30　4SY10–6　個別化食としての「デザイナーエッグ」……○石川伸一（宮城大食産）

4SY11　メダカ～有用モデル生物としての産業応用への展開

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A04 会場（共通講義棟北　1 階　N105）
世話人：人見清隆（名大院創薬科学），橋本寿史（名大生物機能セ）
座　長：人見清隆（名大院創薬科学），橋本寿史（名大生物機能セ）

9:00　4SY11–1　皮膚形成と血液凝固を担うタンパク質架橋酵素のメダカを用いた解析 ‥○人見清隆（名大院創薬科学）
9:25　4SY11–2　メダカでのゲノム編集の基礎と水産業への応用……○木下政人（京都大農）
10:00　4SY11–3　メダカがシアル酸無しでは生きられない事情……○北島　健（名大生物機能セ）
10:25　4SY11–4　メダカを用いた創薬スクリーニングのための基盤技術の開発 ‥○出口友則（産総研バイオメディカル）
11:00　4SY11–5　メダカを用いた社会障害の原因となる分子基盤の解析……○竹内秀明（岡大・院自然）
11:35　4SY11–6　メダカの色素細胞をモデルとした細胞分化制御機構の研究
……○橋本寿史[1]，成瀬　清[2]（[1]名大生物機能セ，[2]基生研）

4SY12　新産業創出に向けてのカイコの役割と展望

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A05 会場（共通講義棟北　1 階　N106）
世話人：朴　龍洙（静岡大グリーン科技研），日下部宣宏（九大農研院）
座　長：朴　龍洙（静岡大グリーン科技研），日下部宣宏（九大農研院）

9:00　はじめに……朴　龍洙（静岡大グリーン科技研）
9:05　4SY12–1　遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産の現状と課題
……○瀬筒秀樹[1,2]（[1]農研機構，[2]東大新領域）
9:30　4SY12–2　カイコを使用した動物用医薬品の生産 ……○田中　剛（東レ株式会社　愛媛工場　動物薬室）
9:55　4SY12–3　カイコ発現マラリアワクチン抗原の機能性について
……○宮田　健[1]，李　在萬[2]，日下部宜宏[2]（[1]鹿児島大学農，[2]九州大農）
10:20　休憩
10:30　4SY12–4　カイコ－バキュロウイルス系を用いて開発された動物用免疫療法薬“アレルミューン HDM”について
……○津久井利広[1]，大隅尊史[2]，阪口雅弘[3]，辻本　元[2]
（[1]ゼノアック，[2]東京大学大学院獣医学専攻，[3]麻布大学獣医学部）
10:55　4SY12–5　組換えタンパク質生産に向けたカイコ糖鎖生物学……○藤山和仁（大阪大学）
11:20　おわりに……日下部宣宏（九大農研院）

4SY13　古くて新しいグルタチオン代謝酵素 γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
～基礎研究によるメカニズムの理解から創薬・食品応用までの展望～

3月18日（日） 9:00～12:00　A06会場（共通講義棟北　1階　N107）
世話人：鈴木秀之（京都工繊大院応生科），和田　啓（宮崎大医），吉本尚子（千葉大院薬）
座　長：和田　啓（宮崎大医），吉本尚子（千葉大院薬），鈴木秀之（京都工繊大院応生科）

9:00　4SY13-1　はじめに：γ-グルタミルトランスペプチダーゼの紹介……○鈴木秀之（京都工繊大）
9:20　4SY13-2　立体構造に基づいた γ-グルタミルトランスペプチダーゼの反応機構とこの阻害剤開発に向けて
……○和田　啓（宮崎大医）
10:00　4SY13-3　破骨細胞活性化因子としての γ-グルタミルトランスペプチダーゼ研究の展開
……○新飯田俊平（国立長寿医療研究センター）
10:40　4SY13-4　ニンニクフレーバーの前駆体生成に関与する γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
……○吉本尚子（千葉大院薬）
11:20　4SY13-5　トランスグルタミナーゼによる食品の物性制御～乳分野への利用拡大に向けた取り組み
……○三輪典子（味の素株式会社）

4SY14　Super cell-factory, *Corynebacterium glutamicum* の最新基盤研究と新たな物質生産システムへの展望

後　援：(一財)バイオインダストリー協会　発酵と代謝研究会
3月18日（日） 9:00～12:00　A07会場（共通講義棟北　2階　N202）
世話人：安枝　寿（味の素・イノベ研），池田正人（信州大農），小川　順（京大院農・応用生命）
座　長：安枝　寿（味の素・イノベ研），小川　順（京大院農・応用生命），池田正人（信州大農）

9:00　4SY14-1　微生物機能を活用する物質生産プロセスの実用化にかける思い……○小川　順（京大院農・応用生命）
9:20　4SY14-2　ビオチン要求性細菌における脂肪酸からビオチンへの代謝変換……○池田正人（信州大農）
9:45　4SY14-3　*Corynebacterium glutamicum* におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望
……○古園さおり[1,2]（[1]東大生物工学セ，[2]理研CSRS）
10:10　4SY14-4　物質生産の際の透過障壁としての細胞表層構造の解析
…… THERESIA Natalia Maria[1]，松田吉彦[2]，岩井伯隆[1]，○和地正明[1]
（[1]東工大生命理工学院，[2]味の素㈱バイオ・ファイン研究所）
10:35　4SY14-5　リグノセルロース系バイオマスを包括的に利用したコリネ型細菌によるバイオモノマー生産
……川口秀夫[1,3]，荻野千秋[2,3]，○近藤昭彦[1,2]（[1]神戸大院イノベ，[2]神戸大院工，[3]CREST JST）
11:00　4SY14-6　高機能化コリネ型細菌によるバイオリファイナリー技術の創製
……○乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）
11:25　4SY14-7　Microbial Cell-factory としての *Corynebacterium glutamicum* の魅力：アミノ酸からタンパク質，そして高分子核酸へ
……○安枝　寿（味の素㈱イノベーション研）

4SY15　中部の企業からの情報発信

【日本農芸化学会中部支部企画】
3月18日（日） 9:00～12:00　A08会場（共通講義棟北　2階　N203）
世話人：山口庄太郎（天野エンザイム），吉村　徹（名大院生命農）
座　長：山口庄太郎（天野エンザイム），吉村　徹（名大院生命農）

9:00　はじめに……山口庄太郎（天野エンザイム）
9:03　4SY15-1　日本における再生医療の産業化と製品開発
……○井家益和（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）
9:26　4SY15-2　本わさび機能性研究の最新知見……○奥西　勲（金印株式会社）
9:49　4SY15-3　寒天事業における今後の展開について……○酒井武彦（伊那食品工業株式会社）
10:12　4SY15-4　チンギスハンも食べていた?!　Sea Buckthorn の機能
……○森　大輔，木村雄輝，長野稜太，後藤智生（株式会社岐阜セラツク製造所）
10:35　4SY15-5　グアーガム分解物の生理機能とその応用……○安川然太（太陽化学株式会社）
10:58　4SY15-6　プレバイオティクス素材イヌリンの生理機能性と食品への応用……○原健二郎（フジ日本精糖㈱）
11:21　4SY15-7　天野エンザイムの事業領域と研究開発……○山口庄太郎（天野エンザイム）
11:44　おわりに……吉村　徹（名大院生命農）

4SY16　海外遺伝資源利用研究を円滑に安全に実施するために
～名古屋議定書国内措置開始，海外遺伝資源利用研究のリスクと課題知っていますか？～

共同主催：日本学術会議 農学委員会・食料科学委員会合同 農芸化学分科会・農学分野における名古屋議定書関連検討分科会
3 月 18 日（日） 9:00～11:40　A09 会場（共通講義棟北　2 階　N204）
世話人：三輪清志（味の素），鈴木睦昭（遺伝研知財室），清水　誠（東農大応生科）
座　長：三輪清志（味の素），鈴木睦昭（遺伝研知財室）

9:00　はじめに……清水　誠（日本学術会議連携会員・東農大応生科）
9:05　4SY16–1　学術分野特に農学分野における海外遺伝資源に関わる名古屋議定書の対応について
……○鈴木睦昭（国立遺伝学研究所）
9:35　4SY16–2　産業界から見た遺伝資源へのアクセスの円滑化と名古屋議定書への対応
……○井上　歩（(一財)バイオインダストリー協会）
10:05　4SY16–3　微生物資源を利用する国際共同研究の実施事例……○鈴木健一朗（東京農大応生科醸造）
10:35　4SY16–4　植物遺伝資源利用は，二つの世界に分かたれている……○山本昭夫（農研機構遺伝資源セ）
11:05　4SY16–5　合成生物学を巡る国際議論の行方とその課題
……○白江英之（一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム）
11:35　おわりに……三輪清志（日本学術会議連携会員・味の素客員フェロー）

4SY17　先端テクノロジー開発で挑む未踏の配列空間からのネオバイオ分子創出戦略

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A10 会場（共通講義棟北　2 階　N205）
世話人：黒田俊一（阪大産研），梅津光央（東北大院工），兒島孝明（名大院生命農）
座　長：黒田俊一（阪大産研）

9:00　はじめに……藤井郁雄（阪府大院理）
9:10　4SY17–1　次世代バイオ医薬：完全デノボ設計分子ライブラリーによる分子標的ペプチドの創出
……○藤井郁雄（大阪府立大理）
9:30　4SY17–2　人工蛋白質ナノブロックによる多様な自己組織化超分子ナノ構造複合体の創出：ネオバイオ超分子の創生を目指して
……○新井亮一[1,2]（[1]信州大繊維，[2]信州大菌類微生物セ）
9:50　4SY17–3　再構成型セルフリータンパク質合成系を用いたタンパク質配列空間と成分濃度空間探索
……○松浦友亮（阪大工生命先端）
10:10　4SY17–4　マイクロドロップレットを用いた高速スクリーニングによるネオバイオ分子創生
……○松村茂祥（富山大・院理工）
10:30　4SY17–5　新規機能性分子スクリーニングを指向した DNA 結合タグによる標的タンパク質の精密空間配置
……○兒島孝明，中野秀雄（名大院・生命農・生命技術）
10:50　4SY17–6　ドメインライブラリー的発想によるタンパク質のキメラ設計：T-cell recruiting 抗体を例に
……○梅津光央（東北大院工）
11:10　4SY17–7　創薬を指向した T7 ファージウィルス上でのネオバイオ分子の創成…○瀧　真清（電通大院情報理工）
11:30　4SY17–8　高集積マイクロウェルアレイシステムによるネオバイオ分子創出
……○上野真吾[1,2]，一木隆範[1,2]（[1]ナノ医療イノベーションセンター，[2]東大工）

4SY18　微生物によるものづくりの新展開：小分子から高分子まで自由自在に

共　催：(一財）バイオインダストリー協会　新資源生物変換研究会
3 月 18 日（日）　9:00～12:00　A11 会場（共通講義棟北　2 階　N206）
世話人：中野秀雄（名大院生命農），田丸　浩（三重大院生物資源），加藤晃代（名城大農）
座　長：中野秀雄（名大院生命農），田丸　浩（三重大院生物資源），加藤晃代（名城大農）

9:05　4SY18–1　シングル B 細胞由来モノクローナル抗体の迅速取得と大腸菌による生産
……○加藤晃代[1]，兒島孝明[2]，中野秀雄[2]（[1]名城大農，[2]名大院生命農）
9:30　4SY18–2　大腸菌遺伝暗号の改変によるタンパク質機能・構造の多様化……○坂本健作（理化学研究所）
10:00　4SY18–3　合成代謝経路構築によるシアノバクテリアのバイオアルコール生産‥○花井泰三，広川安孝（九大農）
10:30　4SY18–4　非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学……○梅野太輔（千葉大院工）
11:00　4SY18–5　DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術
……○池内暁紀[1]，中村里沙[1]，田中秀典[1]，村本伸彦[1]，中村隆宏[2]，小田有沙[2]，太田邦史[2]
（[1]豊田中研，[2]東大院総合文化）
11:30　4SY18–6　麹菌を用いた物質生産における万能な分子育種を目指したゲノム編集技術の確立
……○丸山潤一（東大院・農生科・応生工）

4SY19　AI(人工知能）× バイオ～取り組みの現状と課題

3 月 18 日（日）　9:00～11:30　A12 会場（共通講義棟北　2 階　N207）
世話人：八十原良彦（カネカ），井出寛子（バイオインダストリー協会），髙木　忍（ノボザイムズ ジャパン）
座　長：八十原良彦（カネカ），井出寛子（バイオインダストリー協会），髙木　忍（ノボザイムズ ジャパン）

9:00　はじめに……八十原良彦（カネカ）
9:05　4SY19–1　データ革命がバイオにもたらすパラダイムシフト
……○井出寛子（一般財団法人バイオインダストリー協会）
9:30　4SY19–2　人工知能を利用する～創薬の未来……○奥野恭史（京都大学）
10:15　4SY19–3　AI による画像解析：植物科学への応用
……○朽名夏麿[1,2]，島原佑基[1,2]，馳澤盛一郎[2,1]
（[1]エルピクセル株式会社，[2]東京大学大学院新領域創成科学研究科）
10:55　4SY19–4　バイオ×デジタル融合に向けた AI 技術とスマートセル創製に向けた取組み
……○伊藤潔人（日立製作所）
11:25　おわりに……髙木　忍（ノボザイムズジャパン）

4SY20　新規な「微生物機能」の発掘と戦略的改変：スマートセルによるものづくりを目指して

3 月 18 日（日）　9:00～12:00　A14 会場（共通講義棟北　3 階　N302）
世話人：乾　将行（RITE・バイオ），高木博史（奈良先端大・バイオ）
座　長：乾　将行（RITE・バイオ），高木博史（奈良先端大・バイオ）

9:00　はじめに……乾　将行（RITE・バイオ）
9:05　4SY20–1　ポリエチレンテレフタレート（ PET）分解菌の発見と分解機構の解明
……○平賀和三[1,2]（[1]京都工繊大院・工科･応生，[2]現 RITE）
9:30　4SY20–2　ペプチドグリカンの新しい生成機構……○大利　徹（北大院工）
9:55　4SY20–3　アミノ酸の代謝制御機構と生理的役割に着目した酵母の高機能開発
……○高木博史（奈良先端大・バイオ）
10:20　休憩
10:30　4SY20–4　芳香族アミンの発酵生産プラットフォームを活用したポリマー生産
……○高谷直樹[1]，金子達雄[2]，桝尾俊介[1]
（[1]筑波大・生命環境，[2]北陸先端科学技術大学院大学・環境・エネルギー領域）
10:55　4SY20–5　人工代謝経路の創製による有用化合物の生産……○白井智量（理化学研究所）
11:20　4SY20–6　MD シミュレーションを用いた機能性タンパク質の高機能化法の開発
……○亀田倫史（産総研・人工知能）
11:45　おわりに……高木博史（奈良先端大・バイオ）

4SY21　微生物の多様性 － IFO 寄付講座 10 年の歩み

後　援：公益財団法人発酵研究所
3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A15 会場（共通講義棟北　3 階　N303）
世話人：栗原　新（石川県大生資環），尾仲宏康（東大院農生科）
座　長：栗原　新（石川県大生資環），尾仲宏康（東大農生科），浅水俊平（東大農生科）

9:00　はじめに……尾仲宏康（東大院農生科）
9:05　4SY21–1　ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養系を用いた腸内常在菌の機能解析
……○栗原　新（石川県大生資環）
9:40　4SY21–2　異属細菌間の相互作用がもたらす放線菌特殊代謝……○浅水俊平，尾仲宏康（東大院農）
10:15　4SY21–3　高度難分解性環境汚染物質分解細菌から微生物進化を探る……○永田裕二（東北大学院生命科）
10:50　4SY21–4　メタノール資化酵母 ***Ogataea polymorpha*** のゲノム編集と接合型変換……○金子嘉信（阪大工）
11:25　4SY21–5　微生物の生き様を探る －休眠・覚醒・培養手法の研究を通して見えたもの－
……○鎌形洋一[1,2]（[1]産総研，[2]北海道大農）

4SY22　先進解析技術が拓く糸状菌研究 ～若手研究者が照らすフロンティア～

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A16 会場（共通講義棟北　3 階　N304）
世話人：萩原大祐（筑波大生命環境），樋口裕次郎（九大院農）
座　長：萩原大祐（筑波大生命環境），樋口裕次郎（九大院農）

9:00　4SY22–1　超解像・最新イメージング技術で分かった菌糸生長機構……○竹下典男（筑波大学・生命環境系）
9:30　4SY22–2　ゲノム編集による麹菌実用株の効率的遺伝子改変…○片山琢也，丸山潤一（東大院・農生科・応生工）
10:00　4SY22–3　ゲノム，トランスクリプトーム解析で“視る”糸状菌細胞……○萩原大祐（筑波大 生命環境）
10:30　4SY22–4　麹菌のゲノム解析及びメタボローム解析による清酒成分の生産に関わる制御遺伝子の探索
……○織田　健[1]，岩下和裕[1,2]（[1]酒総研，[2]広大先端研）
11:00　4SY22–5　プロテオミクスを基盤とした植物バイオマス分解に関わる糸状菌由来新規酵素の探索
……○志水元亨，加藤雅士（名城大農）
11:30　4SY22–6　麹菌異種発現を基盤とする天然物探索研究……○浅井禎吾（東大院総合文化）

4SY23　バクテリア細胞膜の機能および構造研究の新展開

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A17 会場（共通講義棟北　3 階　N305）
世話人：西田洋巳（富山県大），大島　拓（富山県大），川崎　寿（東京電機大）
座　長：西田洋巳（富山県大），大島　拓（富山県大），川崎　寿（東京電機大）

9:00　4SY23–1　バクテリアのスフェロプラスト巨大化……○西田洋巳（富山県大）
9:20　4SY23–2　大腸菌形態形成制御因子 **MreB** アクチンと膜タンパク質 **RodZ** の動態の制御
……栗田恵輔[1]，阿合理沙[1]，加藤郁也[1]，仁木宏典[2]，○塩見大輔[1]（[1]立教大理，[2]遺伝研）
9:50　4SY23–3　腸管出血性大腸菌の外膜小胞 **OMVs** の産生と抗菌ペプチド耐性……○戸邉　亨（大阪大学）
10:20　4SY23–4　メカノセンシティブチャネルの機能解析と応用
……○橋本賢一[1]，矢部　勇[1]，中山義敬[2]，Martinac Boris[2]，川崎　寿[1]
（[1]東電大院工，[2]Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia）
10:40　4SY23–5　**Significance of the *Corynebacterium glutamicum* MscCG mechanosensitive channel in fine-tuning of compatible solute accumulation and export**
……○Boris Martinac[1,2], Yoshitaka Nakayama[1], Kosuke Komazawa[3], Navid Bavi[1,2], Ken-ichi Hashimoto[3], Hisashi Kawasaki[3]
([1]Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia, [2]St Vincent's Clinical School, University of New South Wales, Sydney, Australia, [3]Tokyo Denki University, Tokyo, Japan)

4SY24　農芸化学におけるオートファジー研究のこれから

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A18 会場（共通講義棟北　3 階　N306）
世話人：奥　公秀（京大院農），関藤孝之（愛媛大院農），新谷尚弘（東北大院農）
座　長：関藤孝之（愛媛大院農），新谷尚弘（東北大院農）

9:00　4SY24–1　ミクロオートファジーの分子機構，生理機能の多様性……○奥　公秀，阪井康能（京都大農）
9:30　4SY24–2　オートファジーによる鉄イオンのリサイクリング
……○堀江哲郎[1]，堀江（川俣）朋子[2]，大隅良典[2]（[1]日歯大・生命歯，[2]東工大・科技創院）
10:00　4SY24–3　環境に応じた葉緑体分解を担う 2 種のオートファジー経路
……○泉　正範[1,2,3]（[1]東北大・学際研，[2]東北大院・生命科学，[3]JST・さきがけ）
10:30　4SY24–4　植物ミクロオートファジー　～液胞内分解系のバックアップシステムとして～
……○吉本光希（明治大・農・生命科学）
11:00　4SY24–5　選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物
……○有本博一，高橋大輝，一刀かおり（東北大院生命科学）

4SY25　化学で進化・多様性を考える

3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A19 会場（共通講義棟北　3 階　N307）
世話人：永田晋治（東大院新領域），鈴木義人（茨城大農）
座　長：永田晋治（東大院新領域），鈴木義人（茨城大農）

9:00　はじめに……永田晋治（東大院新領域）
9:10　4SY25–1　昆虫による植物ホルモン生産とゴール形成……○鈴木義人（茨大農）
9:40　4SY25–2　昆虫類のステロール生合成の欠損とステロール要求性……○永田晋治（東大院新領域）
10:10　4SY25–3　アゲハチョウの擬態に関わる色と紋様の進化……○藤原晴彦（東大院新領域）
10:40　4SY25–4　陸上植物における生理活性ジテルペノイドの生合成にみられる機能進化
……○川出　洋[1]，宮崎　翔[2]，林謙一郎[3]，岡田憲典[4]，中嶋正敏[2]
（[1]東農工大院農，[2]東大院農，[3]岡山理大理，[4]東大生物工学セ）
11:10　4SY25–5　新世界ザルの嗅覚・味覚受容体とその採食果実の匂い成分を切り口にした霊長類の感覚進化の解明
……○河村正二（東京院新領域）
11:40　おわりに……鈴木義人（茨城大農）

4SY26　微生物および代謝のフロンティア研究

共　催：応用微生物研究協議会
3 月 18 日（日） 9:00～12:00　A20 会場（共通講義棟北　3 階　N321）
世話人：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）

9:00　はじめに……小林達彦（筑波大生命環境）
9:05　4SY26–1　高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内細菌叢変動機構の解析：「胆汁酸仮説」の証明に向けて
……○横田　篤，渡辺真通，藤田祐己，吹谷　智（北大院農）
9:33　4SY26–2　大腸菌におけるエネルギー獲得代謝の遷移機構……○田中　寛（東工大研究院）
10:01　4SY26–3　中心代謝経路を制御する mRNA クロストーク……○宮腰昌利（秋田県大生資科）
10:29　4SY26–4　アーキアにおける ADP 依存型リン酸化酵素が示唆するアーキア代謝の進化
……○跡見晴幸[1,2]，佐藤喬章[1,2]，金井　保[1,2]（[1]京大院工，[2]JST–CREST）
10:57　4SY26–5　メタボロミクスの精密表現型解析への応用……○福崎英一郎（大阪大学院工）
11:25　4SY26–6　ゲノム合成と起動を実践する「枯草菌」シナリオ……○板谷光泰（慶應大学先端生命研）
11:53　おわりに……西山　真（東大生物工学セ）

4SY27　多様なペプチド化合物を創出する微生物が備えた生合成戦略

共　催：科研費新学術領域「生合成リデザイン」
3 月 18 日（日）　9:00～12:00　A21 会場（共通講義棟北　3 階　N322）
世話人：大利　徹（北大院工），濱野吉十（福井県大生物資源）
座　長：大利　徹（北大院工），濱野吉十（福井県大生物資源）

9:00　はじめに……濱野吉十（福井県大生物資源）
9:05　4SY27–1　**streptothricin 類縁抗生物質の生合成酵素群に見出した新規 tRNA 依存型アミド合成酵素**
……○丸山千登勢，濱野吉十（福井県立大学）
9:40　4SY27–2　**直鎖状ホモポリアミノ酸を合成する膜結合型 NRPS 様ペプチド合成酵素**
……○山中一也[1]，老川典夫[1]，濱野吉十[2]（[1]関西大化生工，[2]福井県大生物資源）
10:15　4SY27–3　**中分子創薬に向けた RiPPs 型生合成機構による迅速多様な修飾ペプチド創製手法**
……○尾仲宏康（東大院農）
10:50　4SY27–4　**糸状菌由来リボソーマルペプチド RiPPS の生合成機構**
……○及川英秋，南　篤志，尾崎太郎（北大院理）
11:25　4SY27–5　**カルボニルメチレン構造を有するシュードトリペプチド（Ketomemicin）の生合成機構**
……○大利　徹（北大院工）

4SY28　これからの天然物サイエンス

3 月 18 日（日）　9:00～12:00　A22 会場（共通講義棟北　3 階　N323）
世話人：井本正哉（慶応大理工），上田　実（東北大院理），西川俊夫（名大院生命農）
座　長：井本正哉（慶応大理工），上田　実（東北大院理），西川俊夫（名大院生命農）

9:00　4SY28–1　**天然物の科学：ケミカルバイオロジーと Chemistry & Biology**……○上田　実（東北大理）
9:30　4SY28–2　**アミロイドβの毒性オリゴマーの構造解析に基づくアルツハイマー病の早期診断法の開発**
……○入江一浩（京大院農）
10:00　4SY28–3　**生物活性物質のケミカルスペース拡充戦略：微生物複合培養法及び precursor-directed in situ synthesis（PDSS）法**
……○掛谷秀昭（京大院薬）
10:30　4SY28–4　**人工知能を用いた化学コミュニケーション空間の多様性の解明に向けて**…○榊原康文（慶應義塾大学）
11:00　4SY28–5　**脂質合成を遮断する小分子化合物**……○上杉志成（京都大学）
11:30　4SY28–6　**ラットーマウス間のカイロモンの単離・同定・作用機構**……○東原和成（東大・農・応生）

4SY29　アグリケミカルバイオロジー：生命をつなぐ活性分子とその応用

3 月 18 日（日）　9:00～12:00　A23 会場（共通講義棟北　3 階　N324）
世話人：松田一彦（近大院農），小鹿一（名大院生命農）
座　長：松田一彦（近大院農），小鹿一（名大院生命農）

9:00　はじめに……小鹿　一（名大院生命農）
9:05　4SY29–1　**疫病菌と宿主植物をつなぐ活性分子**……○小鹿　一（名古屋大学）
9:30　4SY29–2　**微生物代謝産物の環境における機能**……○作田庄平（東大院農）
9:55　4SY29–3　**昆虫ホルモン生合成調節のケミカルバイオロジー**
……○丹羽隆介[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]高エネ研物質構造科学）
10:20　4SY29–4　**キノコと植物をつなぐ活性分子**……○河岸洋和（静大グリーン研）
10:45　4SY29–5　**ケミカルテクノロジーによる根圏における植物間相互作用の on と off**……○浅見忠男（東大院農生科）
11:10　4SY29–6　**いもち病菌におけるテヌアゾン酸生合成とイネへの感染戦略**
……○長田裕之，尹　忠銖，本山高幸（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
11:35　おわりに……松田一彦（近大院農）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B02 会場

血糖測定用酵素の開発動向

Development trend of enzymes for blood sugar measurement

○岸本 高英（東洋紡　敦賀バイオ研）
○Takahide KISHIMOTO (TOYOBO Tsuruga institute of Biotechnology)

全世界の糖尿病患者数は、2014 年には 4 億人を超えていると見られており（WHO 発表）、今後も増加の一途を辿ると予想される。自己血糖測定は、糖尿病患者が自分の血糖値を把握し、必要により投薬して血糖値を管理するために非常に重要である。血糖測定のツールとして、酵素法を用いたセンサーが約 40 年前から利用され始め、現在に至るまでに糖尿病患者の増加や血糖センサーの改良・普及などと相まって、原料酵素の需要も飛躍的に増大してきた。

酵素法の血糖測定原理は、比色法と電極法に大別され、比色法ではグルコースオキシダーゼ（GOD）とペルオキシダーゼ、電極法では GOD やグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）が使用され、後者は補酵素の種類によって NAD-GDH, PQQ-GDH, FAD-GDH に分類される。

血糖センサーの改良によって、測定時間の短縮、精度の向上、低（非）侵襲化などが進んできたが、その中で新たな酵素の開発・改良が寄与している部分は大きい。例えば、糖尿病患者に投与した薬剤によって血糖測定値が影響を受けて誤った診断・治療に繋がるという問題があるが、基質特異性の高い酵素が開発されたことで、そのリスクを大幅に低減することが可能となった。また、自己血糖測定の普及や医療費抑制の観点からは、原料酵素を適正コストで大量供給可能な生産技術開発も重要な課題である。

当社では、市場のニーズを踏まえて各種血糖測定用酵素の開発に取り組んできたが、本講演ではその事例も交えて、本分野の現状と課題を紹介したい。

blood sugar, glucose oxidase, glucose dehydrogenase

発表責任者：岸本 高英（Takahide_Kishimoto@toyobo.jp）

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ B02 会場

酵素による希少糖の製造とその産業利用

Production of rare sugar by enzymes and its industrial use

○新谷 知也（松谷化学工業株式会社）
○TOMOYA SHINTANI (Matsutani Chemical Industry Co Ltd)

D-アルロース（別名；プシコース）は，D-フラクトース（果糖）の C-3 のエピマーであり，希少糖（自然界に微量にしか存在しない単糖およびその誘導体）の一種である(1)。D-アルロースは抗糖尿病効果や抗肥満効果を有することが知られている(2)。最近では，老化モデル・線虫 *C. elegans* において，アンチエイジング効果も確認されている(3)。この D-アルロースは D-フラクトースを異性化して製造することができる。単糖の異性化に関しては古くから数多くの研究が行われており，Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein 転移反応が最も有名である。この反応はアルカリ溶液中における糖の異性化反応であり，D-フラクトースや D-グルコース等を出発物質とした場合，D-マンノース等のメジャーな異性体以外に約 10%以下の低い生成率ではあるが，D-アルロース等の希少糖が生成されることも示されていた。そこで我々は，味質・機能性・カロリーの最良バランスを標的として，各種の反応条件を最適化することで，5%の D-アルロースとその他の希少糖を含むシロップを開発した(4,5)。

一方で，酵素を用いて希少糖を生産する戦略図が香川大学の何森健教授によって示されている(1)。この生産戦略図をもとに，我々は D-アルロースの生産酵素となるエピメラーゼを探索した。その結果，土壌から単離した *Arthrobacter globiformis* M30 に D-アルロース-3-エピメラーゼを見出した。本酵素は D-フラクトースと D-アルロースの間の C-3 エピマー化を触媒し，D-アルロースへの変換率は 27%であった。また，本酵素は，既報の他酵素とは異なり，マグネシウムイオンの存在下で最大の活性および熱安定性を示した。酵素をイオン交換樹脂に固定化し固定化酵素を作製したところ，遊離酵素よりも高い保存安定性を示した。そして，固定化酵素を用いたカラム反応において，固定化酵素 1 リットルあたり 215kg の D-アルロースが生産できることを確認した。この生産量はこれまで学術雑誌に報告された D-アルロースの生産法の中でも最も高い値であった(6)。本酵素は D-アルロースの工業的な大量生産に有用であることが示唆された。

1)新谷知也，飯田哲郎，2015，明日の食品産業，4，34-41.
2)Shintani，T.，2017，J. Agric. Food. Chem.，13，2888-2894.
3)Shintani，T.，2017，Biochem. Biophys. Res. Commun.，493，1528-1533.
4)新谷知也他，2011，日本食品科学工学会大会講演集，58，129.
5)高峰　啓他，2015，応用糖質科学，1，44-49.
6)Yoshihara，A.，Kozakai，T.，Shintani，T.，et al.，2017，J. Biosci. Bioeng.，123，170-176.

D-allulose, enzyme production, rare sugar

発表責任者：新谷知也（tomoya-shintani@matsutani.co.jp）

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ B02 会場

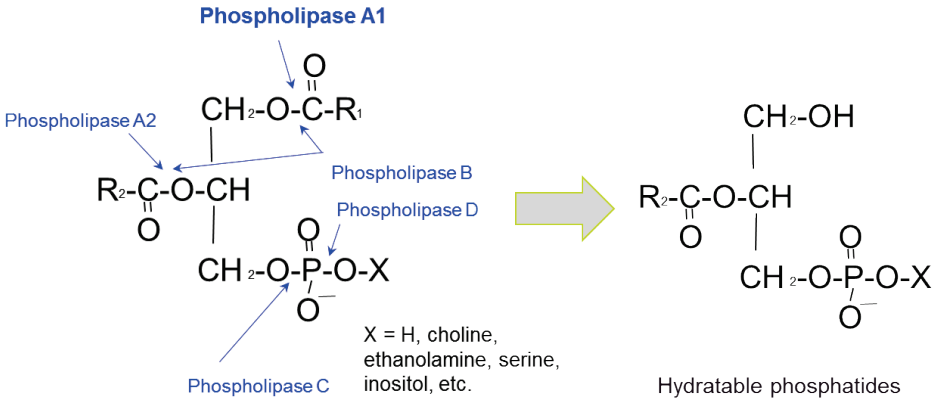
植物油製造における酵素利用
Enzyme applications for vegitable oil production
○眞野 弘範（ノボザイムズジャパン）
○HIRONORI MANO (Novozymes Japan)

植物油はダイズ、ナタネ、パーム、ヒマワリなど様々な植物から生産されている。その生産量は年率約５％で伸び、年間２億トンに達しようとしている。植物油の製造はより収率が高く、効率的で、環境への負荷が少ない方法、また健康への影響が懸念される物質、例えばトランス脂肪酸や３－MCPD などがなるべく生成しないような生産、加工方法が求められている。

圧搾・抽出により得られた粗油には様々な不純物が含まれており、油の風味や、色、安定性、加工特性を向上させるために精製される。不純物として主にリン脂質などのガム質を取り除く工程が脱ガムと呼ばれ、アルカリ処理や水和処理が行われているが、ここにホスホリパーゼを働かせることで、油の収率を改善し、水や化学薬品の使用量を減らすことが可能になる。

酵素を利用することによって脱ガム時のコストの低減とともに、環境負荷を減らすことができることから海外では既に酵素を用いた脱ガム（酵素脱ガム）が一般的となってきている。一方、日本ではこれまで脱ガム工程で効果的に働く酵素が利用できなかったことから、酵素脱ガムが実用レベルで行われる事はなかった。昨夏、脱ガム工程で効果的に働く A1-ホスホリパーゼが日本でも認可されたことから、今後日本においてもこの分野での酵素の利用が進むことが期待される。本講演では酵素の脱ガムへの利用原理、効果を中心に、植物油の精製、加工における酵素の利用技術を紹介したい。

（図：A1-ホスホリパーゼによって、リン脂質の水和性を高め除去しやすくする）



phospholipase, degumming, vegitable oil

発表責任者：眞野　弘範（hrnm@novozymes.com）

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ B02 会場

バイオレメディエーション；土壌汚染を自然の浄化作用で解決
Soil contamination solution by the use of bioremediation

○川原 恵一郎 (株式会社アース・ソリューション)
○Keiichiro Kawahara (Earth Solution Inc.)

私たちは、経済発展を遂げ成熟した社会が直面している環境汚染やそれに伴う健康被害の解決に対して「低コストで高品質の技術サービスを安定的に提供できるビジネス」が重要であると考えます。その中で特にニッチな分野であるバイオレメディエーションやバイオアッセイなどに関する事業開発を行ってきました。

バイオレメディエーション事業の背景には、有害化学物質により汚染された土地の土壌・地下水汚染を浄化するという目的があります。国内では 2003（平成 15）年に土壌汚染対策法が施行されるなど、現在では多くの技術開発や浄化事例が公表されています。土壌汚染で多用される対策法には「掘削除去」があります。それは汚染土壌を掘削して場外に持ち出し、焼却施設などで処理する物理的な手法ですが、最もコストやエネルギーがかかります。一方、バイオレメディエーションは、微生物がもつ自然の浄化機構を利用する技術です。最近では、築地市場の移転先であるガス工場跡地・豊洲においても複数の土壌汚染対策手法が採用され、そのひとつとして利用されました。

微生物による有害物質の分解については様々な研究成果が発表されています。その中には、特定の化学物質を分解する微生物単体の同定、あるいは微生物群の解析、さらには分解プロセスや酵素の働きなどの研究事例などがあります。バイオレメディエーションの利用の形態としては、特定の分解微生物を培養して現地に散布する方法や、建設機械で汚染土壌を掘り上げて、分解資材を混合して分解させる方法などがあります。私たちが事業として展開するのは、自然の浄化機構を最大限活かす低コスト・低環境負荷の浄化ソリューションです。そのために、汚染地においては、汚染物質が地中にあるその位置で在来微生物を直接活性化させる方法（原位置バイオスティミュレーション）を優先的に用います。この方法の利点は、分解微生物に必要な栄養源を投与するだけというシンプルなもので、コストやエネルギーを最小にすることができるというところです。しかし、分解対象の汚染物質を分解する微生物が地中に存在しているということや、浄化基準（一般的には環境基準）までの分解ができることを事前評価することが求められます。その上でプロジェクトとして予算や工期を設計できるかというマネジメントの難しさが伴います。

私たちは、これまで独自の設計法・微生物の栄養剤・施工法を開発し、油・重金属・ＶＯＣ対策など取り組んできました。その他にも世界でも例が少ない農薬のひとつであるＨＣＨ（ヘキサクロロシクロヘキサン）という対象物質についても事例があり、現場データなどとあわせて説明します。

in-situ biostimulation, nutrients, HCH

発表責任者：川原　恵一郎（kawahara@earthsolution.co.jp）

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ B02 会場

ベストサイエンスが産業を生む
The best science creates a new industry
○栗木 隆 (江崎グリコ株式会社)
○Takashi Kuriki (Ezaki Glico Co., Ltd.)

21 世紀はバイオテクノロジーの時代と言われた 1980 年代，学術界も産業界もこの領域への資源投入を高めた．成功例も少なくはないが，投入された資源に対して生み出された価値は，我が国では期待値を超えていないのではないか．私たちは，1980 年代後半から糖質関連の酵素工学とその利用による新しい事業に取り組んできた．技術開発による産業創出は多くの学ぶべき点を私たちに示したが，ここではそれを振り返り，以下の観点から，重要な学び点を今後の課題とともにお話したい．

１． The best science or/and the best application
２． 概念の提案は重要な科学
３． α－アミラーゼファミリーの概念の提唱
４． Bigshots 二人との論争（今では友人）
５． 「酵素の構造決定？もっと意味のある仕事をしましょう」
６． 研究の戦略は事業化の戦略に従う（勝たなければ意味が無い）
７． 既知の酵素でも良く考えれば新しい反応が見つかる
８． α－アミラーゼファミリーの概念からすれば酵素の特異性はより良く変えられる
９． 巨大企業に立ち向かう戦略と戦術
１０． 基礎研究とその応用やモノ作りまでなら何とかなるが，これを事業や産業にすることが大切で大変

enzyme engineering, α-amylase famiy, industry

発表責任者：栗木　隆（kuriki-takashi@glico.co.jp）

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B03 会場

多様な乳酸菌抗菌ペプチドの探索とその可能性

Screening of various antimicrobial peptides from lactic acid bacteria and their potential

○善藤 威史、園元 謙二（九大院・農）
○Takeshi Zendo, Kenji Sonomoto (Fac. Agric, Kyushu Univ.)

乳酸菌の中には、リボソーム上で生合成されるバクテリオシンと総称される抗菌ペプチドを生産するものが存在する。乳酸菌バクテリオシンは一般に耐熱・耐酸性、無味無臭で、主にグラム陽性菌の生育を阻害し、発酵食品の保存性向上への寄与が考えられることから、食品保存料としての利用が期待されている。これまでに様々な乳酸菌バクテリオシンが見出され、とくに乳酸菌 *Lactococcus lactis* の一部の株によって生産されるナイシン A は、日本を含む多くの国々で食品保存料として実用され、さらにその高い安全性を基盤として様々な用途への展開が検討されている。我々も手指用殺菌洗浄剤や牛乳房炎の予防剤・治療剤へのナイシン A の利用を検討したほか、ナイシン A と梅エキスを組み合わせ、虫歯菌や歯周病菌への高い抗菌活性と同時に高い安全性を実現した口腔用抗菌剤を開発した。本抗菌剤を含めて天然由来成分のみを利用して開発した口腔ケア製品は飲み込んでも安全で、誤飲しやすく口腔ケアの困難な要介護高齢者などに利用されている。また、最近では真菌にも効果がある口腔カンジダ症対策の新製品も販売を開始し、さらに注目を集めている。

一方、乳酸菌バクテリオシンの構造や特性はきわめて多様で、ナイシン A に続く実用化を目指して新奇乳酸菌バクテリオシンの探索が広く行われている。ナイシン A とは異なる特性をもつバクテリオシンを利用することで、ナイシン A の弱点を補いつつ、より広範な用途への対応が可能になると考えられる。そこで、我々も新奇乳酸菌バクテリオシンの獲得を目指し、抗菌スペクトルと分子量を指標とした迅速スクリーニング法を構築し、その利用によって多数の新奇乳酸菌バクテリオシンを見出し、それらの構造や機能を明らかにすることができた。とくに、リーダー配列を持たないリーダーレスバクテリオシンであるラクティシン Q や、ラクトサイクリシン Q をはじめとする環状バクテリオシンを見出すことができ、それらの構造を決定するとともに、生合成機構や作用機構の一端を明らかにすることができた。他にも、性質の異なる複数のバクテリオシンを同時に生産する乳酸菌や、特定の菌種に選択的に抗菌活性を示すバクテリオシンなどが見出された。

得られた多様な乳酸菌バクテリオシンの中から、それらの特性をもとに、用途に応じた最適なバクテリオシンの選択ができれば、より安全な微生物制御の実現が可能となる。その用途は、食品保存料や医薬品関連をはじめ、畜水産飼料、化粧品など、安全な抗菌剤が求められる多くの分野に及ぶと考えられる。さらには、乳酸菌バクテリオシンの構造と作用機構、生合成機構を基盤とすることで、より優れた抗菌ペプチドの創出も期待される。

bacteriocin, lactic acid bacteria, nisin

発表責任者：善藤　威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:40～ B03 会場

遺伝子組換え抗菌ペプチドの高効率生産技術とその応用

Efficient production of recombinant antimicrobial peptides

○相沢 智康（北大先端生命）
○Tomoyasu Aizawa (Hokkaido Univ.)

細菌をはじめとする微生物に対して抗菌活性を有する抗菌ペプチドは、幅広い動物や植物において自然免疫を担うペプチド性の生体防御因子である。その作用機構は、微生物の膜の破壊が主要とされるが、詳細には未知の点が多く残される。例えば、膜を透過したペプチドが細胞内分子を標的とした作用を持つ例も明らかになってきており、抗菌ペプチドの活性発現機構解明への研究が数多く進められている。また応用利用を目標とした研究でも、耐性菌の出現が問題となっている既存の抗生物質に代わる創薬分野のシーズなどとしても大きく期待されている。

このような背景から基礎・応用研究の両方面で、抗菌ペプチドの効率的な生産技術は欠くことができない。しかし、天然からの精製による生産は効率や収量が悪いだけでなく、配列改変の困難さもあり、これらの目的には適していない。ペプチドの合成に広くに用いられる固相化学合成は有効かつ最も一般的な生産手法ではあるが、比較的鎖長の長いペプチドの合成においては、精製や合成コストなどの問題が生じる。特に、演者の専門分野である NMR 法による解析を著しく効率化させることが可能な、安定同位体標識試料の調製においては、例え短鎖であっても固相合成法により全長を標識した試料を生産することは、合成コストの面から現実的ではない。

このような問題に対して、抗菌ペプチドの遺伝子組換え微生物による生産も広く検討されており、演者も長年に渡りこの課題に取り組んできた。しかし、明確な立体構造を有するタンパク質の生産と比較すると、短鎖のペプチドでは宿主プロテアーゼによる分解が効率的な生産における大きな問題となる。また、抗菌ペプチドでは、生産したペプチドの微生物宿主に対する毒性の回避も重要なポイントとなる。そこで本シンポジウム講演では、演者の研究グループが最近開発に成功した、大腸菌および酵母を発現宿主とした抗菌ペプチド生産技術 [1)-3)]とその特徴について発表するとともに、得られた抗菌ペプチドを用いた NMR 法による構造生物学解析での研究例 [4)]や、微生物検出技術 [5)]、創薬への応用 [6)]の可能についても議論したい。

参考文献

1) Tomisawa S, *et al.*, **Protein Expr. Purif.**, 112, 21-8 (2015)
2) Ishida H, *et al.*, **J. Am. Chem. Soc.,** 138, 11318-26 (2016)
3) Kuddus MR, *et al.*, **Protein Expr. Purif.,** 122, 15-22 (2016)
4) Baek MH, *et al.*, **J. Pept. Sci.,** 22, 214-21 (2016)
5) Yonekita T., *et al.*, **J. Microbiol. Methods.**, 93, 251-6 (2013)
6) Hayase E., *et al.*, **J. Exp. Med.**, in press

antimicrobial peptides, overexpression, NMR

発表責任者：相沢智康（aizawa@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:15～ B03 会場

昆虫由来抗菌ペプチドの応用に関する研究

Studies on application of antimicrobial peptides derived from insect

○石橋 純（農研機構）
○Jun Ishibashi (NARO)

「抗菌ペプチド」はあらゆる生物に存在し、幅広い生体防御反応に関与しており、新奇の抗生物質などへの様々な応用が期待されている。本講演では、カブトムシから単離したディフェンシンを改変して開発したペプチドの応用の試みについて紹介する。

カブトムシディフェンシンは 43 残基の抗菌ペプチドであり、抗原性を示す可能性があること、大きい分子では生産コストがかかることから、その応用に向け、抗菌活性に必要な部分を同定し、低分子量化をはかった。さらに種々のアミノ酸置換を行うことにより、強い抗菌活性を示し、溶血活性は示さない 9 残基のカブトムシディフェンシン改変ペプチドを開発した。これらのペプチドの作用機構の解析を行ったところ、負電荷を帯びた細胞膜を標的とし、カーペットモデルに近い形で細胞膜を崩壊させることが明らかになった。これらのペプチドの抗原性は非常に低く、耐性は生じにくく、既存の抗生物質と相乗作用を示した。また、これらのペプチドを MRSA 感染マウスに投与したところ、治療効果を示した。

カブトムシディフェンシン改変ペプチドは負電荷を帯びた細胞膜を持つ細胞をターゲットとする。ほ乳類の正常細胞の細胞膜表面は電気的に中性であることから、カブトムシディフェンシン改変ペプチドは細胞毒性を示さない。一方、がん細胞では細胞膜表面が負電荷を帯びることが知られていることから、カブトムシディフェンシン改変ペプチドのがん細胞に対する影響を調べたところ、骨髄腫細胞などの細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかになった。また、ミトコンドリアは好気性細菌を起源とする細胞内オルガネラであり、ミトコンドリア膜も負電荷を帯びることが明らかになっている。カブトムシディフェンシン改変ペプチドは単離したミトコンドリアに傷害を与えたのみならず、細胞内に導入するとミトコンドリアに傷害を与え、アポトーシスを誘導した。このことから、DDS を利用して選択的に細胞内に導入することにより、特異性の高い薬剤への応用が期待される。

抗菌加工製品の市場規模は 1 兆円といわれ、我々の身の回りには多くの抗菌加工製品が見られる。新たな抗菌加工剤として、カブトムシディフェンシン改変ペプチドを応用する試みについても紹介する。

antimicrobial peptide, insect

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:50～ B03 会場

納豆抽出抗菌ペプチドの抗がん剤への応用

Application of natto extract antimicrobial peptides to anticancer agents

○伊藤 英晃（秋田大院理工）
○Hideaki Itoh (Akita Univ.)

納豆抽出成分の各硫安分画をヒト子宮頸がん由来細胞の HeLa 細胞に投与し，48 時間後の細胞生存率を測定した。コントロールに比較し，納豆抽出成分非分画，分画 A (0-30%飽和)，及び分画 D (70-100%飽和)投与群では約 80%の細胞が生存した。分画 C (50-70%飽和) 投与群では約 62%生存率であり，非分画，分画 A，C, D では僅かな抗がん作用を呈した。一方，分画 B (30-50%飽和) 投与群では，接着細胞である HeLa 細胞が死滅し，細胞が浮遊した。納豆抽出成分分画 B には，強力な抗がん作用のあることが判明した。

我々は納豆以外の煮豆抽出成分や納豆菌での抗がん作用を解析するため，納豆菌添加直前の煮豆抽出成分分画 B，及び納豆菌を HeLa 細胞に投与し，24 時間後の顕微鏡画像を解析した。納豆抽出成分分画 B の結果と異なり，細胞生存率には全く変化が生じなかった。また，マウス神経芽細胞腫細胞の Neuro 2A 細胞や，ヒト肝臓がん細胞 HEPG2 細胞，ヒトバーキットリンパ腫由来がん細胞の Raji 細胞等の培養がん細胞は，納豆抽出成分分画 B により死滅し，がんの種類には無関係であった。一方，ヒト胎児腎臓由来細胞の HEK293 細胞での高生存率が維持された。

納豆抽出成分分画 B 成分を，カラムクロマトグラフィーによりさらに分離精製した結果，抗がん作用を示す分子は，5kDa ペプチドであることが判明した。ペプチドシークェンスの結果，ズブチリシンの C 末端側の 45 残基であった。ペプチドの二次構造予測の解析の結果，α –ヘリックスに富む両親媒性で，かつ数残基ごとに塩基性アミノ酸を含む構造であった。これは，α–ヘリックスのある面に沿って親水性の残基が並び，反対側には疎水性の残基が並ぶという抗菌ペプチドの特徴と一致した。

納豆抗菌ペプチドは，なぜがん細胞を殺傷したのかに関しては，多くのがん細胞表面は正常細胞と比較し，フォスファチジルセリンやムチンなどの陰性荷電分子が高発現する。そのため，正常細胞の膜と比較してがん細胞の細胞膜は，強い負荷電を呈する。Raji 細胞が消滅したのは，納豆抗菌ペプチドによってがん細胞膜破壊が誘導されたためと考えられる。一方，同一濃度の納豆抽出液流安分画成分 5kDa ペプチド投与 HeLa 細胞と比較し，HEK293 細胞での高生存率が維持されたのは，細胞膜表面荷電の相違が考えられる。

我々の研究から，納豆には強力な抗がん作用を呈する新規抗菌ペプチドが含まれており，この抗菌ペプチドは，一部のウィルス，細菌も死滅させる機能を有することが判明した。海外では，昆虫の抗菌ペプチドを用いた皮膚がんやメラノーマの治験が開始されており，治験結果が注目されている。

antimicrobial peptide, anticancer agents, natto

発表責任者：伊藤英晃（itohh@gipc.akita-u.ac.jp）

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B04 会場

栄養素の起源　ー栄養素はいつ生まれ、どう進化したかー

On the origin of nutrients

○小田 裕昭（名古屋大生命農学）
○Hiroaki Oda (Nagoya Univ.)

必須栄養素の起源はいつどのような理由から決められたのだろうか。多くの栄養素は、その合成能（つまりその遺伝子）を失ったことによって必須となった。必須アミノ酸をみてみると、原生生物にも必須アミノ酸があり、ほぼ動物と同じである。ゲノムデータベースから調べると、原生生物の一部でほぼ同時期にごっそりと約 10 種類のアミノ酸の生合成経路が失われている。真核生物の進化の中で必須アミノ酸は少なくとも 2 回から 3 回のその生合成経路を失ったことがわかった。この理由として、必須アミノ酸の合成経路は非必須アミノ酸に比較して長いため、コストがかかる合成経路を失ったと考えられる。そしてそれは真核生物になり獲得した膜系の発達、細胞外の生物を丸ごと飲み込むエンドサイトーシス、がすべてのアミノ酸を一定量供給可能にしたため、合成経路の長い内部事情が選択圧として働くことにより約 10 種類のアミノ酸合成能を失ったと考えられる。

一方、必須脂肪酸は一部の動物でのみ存在し、Δ12 不飽和化酵素の欠損が大きな原因の一つであるが、たとえ不飽和化ができなくても多価不飽和脂肪酸を必要としない生物種も多い。真核生物になり、多価不飽和化反応を発達させ、一部の動物種は不飽和化とは無関係にある脂肪酸を必要とするようになったようである。

ステロール合成能は真核生物になって獲得したものであるため、ビタミン D はそれ以降に生まれた。核受容体は動物でのみで見られ、ステロイドホルモン様内在的リガンドと受容体という内分泌システムとして発達したものが、ビタミン化したものと考えられる。一方、ビタミン A の場合は、植物由来の外来リガンドを利用した応答反応を可能にする核受容体の進化がビタミン化を進めたと考えられる。

水溶性ビタミンでは、合成能を失い再獲得したものの再欠損が起きたビタミン C が有名である。一方、ビタミン B12 は極めて複雑な化学構造を持つ分子であるため、合成能をもつ生物は限られる。また、それを補酵素として必要とする酵素も限られている。そのため、ビタミン B12 を必要としない生物種も多く、B12 の合成能と必要性の組み合わせがその必須性を決定したようだ。

このように栄養素の必須性の起源を見ていくと、多くの栄養素で、合成能の欠損だけでなく必要性の変化が独立して起きて、その必須性がそれぞれの事情で起きている。それに対して、必須アミノ酸の起源には一定の法則性が見られ、必須アミノ酸の特殊性が見えてくる。栄養素の起源の中に生命の生存戦略が垣間見える。

evolution, nutrients, essential amino acids

発表責任者：小田裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ B04 会場

タンパク質必要量とその認識機構

Protein requirement and the recognition of the protein requirement

○金本 龍平（京大院食品生物）
○Ryuhei KANAMOTO (Kyoto Univ., Food Sci. and Biotechnology.)

タンパク質は脂質、糖質とともに三大栄養素の一角をなすが、他の２つとは異なり貯蔵形態を持たないため、その出納値から必要量を求めることができる。成長期ラットはタンパク質栄養に鋭敏に応答し、餌のタンパク質含量が不足している、あるいは栄養価の低いタンパク質を与えると、たちどころに摂食量を減じることはよく知られている。不思議なことに、摂食抑制は餌を与えた直後から始まる。しかし、成熟したラットは無タンパク質食を与えても当初は摂食抑制が見られず、除脂肪体成分の減少と共に摂食量が低下していく。つまり、成長期ラットは低タンパク質栄養状態に陥った結果摂食量を減じるのではなく、タンパク質必要量を認識し、餌の栄養環境に適応するように摂食量を制御しているのではないかと推察される。

ところで、可欠アミノ酸は体内で合成され、必ずしも食餌から摂取する必要のないアミノ酸であることから、栄養学的には非必須アミノ酸と呼ばれている。しかし、体内においては全てのアミノ酸が必須であり、むしろ可欠アミノ酸はその必須性ゆえに食餌のみに依存出来ないアミノ酸と考えることが出来る。事実、各臓器の遊離可欠アミノ酸濃度は不可欠アミノ酸の３倍から 4 倍にもなる。そこで、可欠アミノ酸合成とタンパク質必要量の関係をアスパラギン合成酵素(AS)とセリン合成の律速酵素である３−ホスホグリセリン酸脱水素酵素(PHGDH)、およびセリン脱水酵素(SDH)の肝臓における発現を指標に調べた。その結果、これらの酵素はタンパク質必要量を境に発現が逆転し、AS と PHGDH は必要量以下の、SDH は必要量以上の食餌タンパク質量で誘導される事が示された。この誘導は餌を換えて与えた直後から起こり、例えば低タンパク質で飼育し AS と PHGDH 誘導したラットに高タンパク質食を与えると、摂食 2 時間後にすでに mRNA 量が減少しており 12 時間後にはその発現はほとんど見られなくなった。しかし、この時点で酵素タンパク質量の発現には変化がなかった。そこで、高タンパク質と低タンパク質の餌を交互に与え数日間飼育して発現量を測定してみると、mRNA 量は前日の餌を反映し、酵素タンパク質量はそれぞれの餌で飼育し続けた場合の平均値となっていた。このことは食餌タンパク質の情報は摂食毎に認識されるが、あたらしい影響環境に適応するには数日を要する。つまり情報の蓄積により一定の栄養環境になったことを認識して適応する事を示唆している。

培養細胞とは異なり、動物の場合は摂食、消化を経て栄養素が吸収される。この過程のどこでタンパク質栄養の必要量に対する認識がなされているかほとんど明らかにする事は出来なかった。しかしながら、栄養素の認識は驚くべき精度でなされることがわかった。更なる研究の発展を期待したい。

protein nutrition, requirement, dispensable amino acid

発表責任者：金本龍平（kanamoto@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ B04 会場

エネルギー欠乏への対応戦略

strategy to respond energy deficit

○矢作 直也（筑波大医）
○Naoya Yahagi (Tsukuba Univ.)

私たちの身体にとって、栄養の摂取は生命の維持に必要不可欠でありながら、過剰に摂取すれば肥満や動脈硬化に繋がり、健康を害する元となる。すなわち栄養とは両刃の刃であり、その摂取と消費を上手にバランスさせることは健康的な生命活動にとって極めて重要である。しかしながら、それがどのようなしくみで実現されていて、どのようなときに破綻してしまうのかについてはまだまだ未知のことが多い。

今回の発表では、摂食応答と飢餓応答の繰り返しである食サイクルの中でも特に飢餓応答の方に焦点を当て、絶食時に我々の身体の中でどのような制御機構が働いているのかをさまざまな観点から眺めてみたい。

絶食時のヒトでは、肝臓・骨格筋・脂肪組織などのエネルギー貯蔵臓器と脳・心臓などのエネルギー消費臓器との間でグルコース・脂肪酸・ケトン体などのエネルギー運搬代謝物をやり取りしながら全身のエネルギー代謝を支えている。これらの複数の代謝経路が組み合わりながら正しく機能するには、多臓器にまたがる精緻な調節機構の働きが必要であるが、まだ全貌が明らかになっているとは言い難い現状である。

そのような中で、特に、「糖代謝と脂質代謝のつながり」という視点から、エネルギー欠乏への対応戦略について最近我々が明らかにできた新しい知見を本シンポジウムで紹介したい。

Nutrigenomics, fasting response, energy metabolism

発表責任者：矢作直也（nyahagi-tky@umin.ac.jp）

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ B04 会場

進化から学ぶインスリン様成長因子／インスリンシステムの生理的意義
Lessons about Physiological Significances of Insulin-Like Peptides from Evolution

○高橋 伸一郎（東京大学・院・農学生命科学）
○Shin-Ichiro Takahashi (Univ. Tokyo)

哺乳類のインスリン様活性を仲介する代表的なホルモンとして、インスリンとインスリン様成長因子（IGF）が挙げられる。IGF には、更に相同性の高い IGF-I と IGF-II の二種類のアイソフォームが存在し、いずれもプロインスリンに類似した構造を有している。IGF とインスリンには類似点も多いが、同時に、産生臓器や分泌刺激、血中動態や生理活性など、明らかに異なる性質も有している。特に生理活性は、インスリンが糖・アミノ酸の取り込み促進、グリコーゲン合成・脂質合成の促進、糖新生の抑制など、短期の代謝制御活性が強いのに対して、IGF は、細胞増殖・分化の誘導、細胞死の抑制、細胞運動の促進、RNA 合成・タンパク質合成の促進など、細胞の運命を決定するような長期作用が強い点が特徴である。いろいろなモデル動物のゲノム解析によって、IGF／インスリンシステムの分子進化についての知見が集積しつつある。単細胞真核生物の代表である酵母にはインスリン様ペプチドの遺伝子は確認できないが、旧口動物の線虫では 38 種類、ショウジョウバエでは 7 種類のインスリン様ペプチドの遺伝子が存在している。これらは主に神経系細胞で産生されており、栄養状態をはじめとした生体の置かれた状況に応答して分泌が制御されている。一方、これらの生物には IGF-I 受容体／インスリン受容体に相同性の高い受容体が一種類だけ存在している。以降のシグナル伝達系は哺乳類とも良く似ており、これらの経路を介して末梢組織の代謝を調節、その結果成長・成熟・老化などが制御されている。この伝達系のシグナル分子の機能を欠損させるとその生物は長寿命となる点は特記すべき点である。これに対して、新口動物である脊索動物ではインスリン様ペプチドは一種類である。個体サイズが大きくなり、大量に取り込んだ栄養素を代謝する必要が生じた脊椎動物の前後の段階で、IGF とインスリン、IGF-I 受容体とインスリン受容体の遺伝子がそれぞれ出現する。これによって、IGF システムがタンパク質代謝の調節を介して発達・成長・成熟・老化などの長期作用を制御、インスリンシステムがエネルギー代謝などの短期作用を制御という分業化が行われ、更に GH-IGF-I axis などの構築も起こったと考えられる。したがって、新口動物ではインスリン様ペプチドの種類を、旧口動物のように多種類にしないという戦略で進化が進んだことが、IGF／インスリンの生理的意義を複雑にしていると言うこともできる。このように IGF／インスリンシステムは、線虫からヒトに至るまで修飾を受けながら進化してきた。進化の過程で獲得してきた生理活性は、哺乳類の一生のいろいろな場面で発現しており、これらはそれぞれのホルモンの産生・分泌、血中動態、細胞内シグナル伝達の段階で、生体の置かれた状況に応じて緻密に制御されているのである。

insulin, growth, metabolism

発表責任者：高橋 伸一郎（atkshin@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ B04 会場

巨大ウイルスの“食”　～宿主との相互作用を通じた独自戦略～

Strategy of giant viruses for survival via the interaction with host cells

○武村 政春（東京理科大理）
○Masaharu Takemura (Tokyo Univ. Sci.)

ものを食べるという行為、すなわち“食”は生物に特有の行動であると考えられているが、外部から栄養を得て自らの構造や機能を維持するという現象そのものは、生物とは一線を画す存在である「ウイルス」にも存在する。20 世紀までに知られてきた数々の病原性ウイルスも、複製、代謝の過程のほとんどを宿主に依存する点で“従属栄養的”であると言えるが、2003 年にミミウイルス（*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*）が見出されて以来、世界中の数多くの水環境などから分離されてきた「巨大ウイルス」は、それまでのウイルスとはやや様相を異にする。

巨大ウイルスは、核細胞質性大型 DNA ウイルス（nucleo-cytoplasmic large DNA virus）に分類される二本鎖 DNA ウイルスで、一般的には 200 nm 以上の粒子径、300 kb 以上のゲノムサイズを持つものをいい、現在までにミミウイルス科、マルセイユウイルス科、パンドラウイルス属（科）、ピソウイルス属（科）、モリウイルス属（科）などが知られ、それぞれ 400 種類以上の遺伝子をコードする。多くがヨーロッパ、アフリカ、南アメリカから分離されたものだが、日本からも最近、筆者らによってマルセイユウイルス科 *Tokyovirus*、新科 *Medusavirus* などが分離されてきた。

巨大ウイルスは従来のウイルスとは異なり、複数の翻訳関連遺伝子を持つことが知られており、ほとんどの巨大ウイルスが tRNA 遺伝子をゲノムにコードし、さらにミミウイルス科ではアミノアシル tRNA 合成酵素（aaRS）遺伝子をゲノムにコードする。ミミウイルス科は最大 7 種類の aaRS 遺伝子をコードすることが知られているが、最近メタゲノム解析により存在が明らかになった *Klosneuvirus* は、19 種類もの aaRS 遺伝子をコードすることが明らかとなった。

リボソームを持たず、その生活環は宿主に完全に依存するにもかかわらず、なぜ巨大ウイルスは自らのゲノムに aaRS 遺伝子をコードしているのか。ミミウイルス科では、宿主であるアカントアメーバを栄養飢餓状態に置くと、これら aaRS 遺伝子の発現量が亢進することが知られており、aaRS 遺伝子を自ら持つことで“不測の事態”に対処することができるというメリットがあると考えられるが、その進化的な詳細は明らかではない。*Medusavirus* のゲノム解析からは、このウイルスが宿主であるアカントアメーバとの間で多くの遺伝子を水平移動により獲得あるいは供与してきたことが明らかとなり、巨大ウイルスの進化と宿主との相互作用に密接な関係があることが示唆されている。果たして巨大ウイルスは、宿主である生物との相互作用を通じて、どのような戦略のもとでその“体”を維持するしくみを編み出してきたのか。現在までに明らかになっている知見をもとに議論したい。

giant viruses, aminoacyl-tRNA synthetase, Mimiviridae

発表責任者：武村政春（takemura@rs.kagu.tus.ac.jp）

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B05 会場

グルテニン遺伝子型の情報を利用した加工適性の優れる小麦品種の育成

Breeding of wheat varieties carrying superior processing qualities using glutenin genotypes.

○伊藤 美環子、寺沢 洋平、長澤 幸一、八田 浩一（農研機構　北海道農業研究センター）
○Miwako Ito, Yohei Terasawa, Koichi Nagasawa, Koichi Hatta (HARC/NARO)

小麦粉のタンパク質は弾力のあるグルテニンと伸展性のあるグリアジンから成るグルテンと呼ばれるタンパク質が大部分を占めている。グルテニンはさらに高分子量グルテニンサブユニット(HMW-GS)と低分子量グルテニンサブユニット（LMW-GS）に大別され、前者は *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*、後者は *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3* のそれぞれ３つの遺伝子座上にある対立遺伝子にコードされている。発表者が所属する小麦育種グループでは、主に秋播の硬質小麦（主にパン・中華麺・パスタ用）品種の育成を行っており、上記の各遺伝子座の対立遺伝子の組合せが生地物性や加工適性に大きく影響するため、これらの加工適性とグルテニン遺伝子構成との関係を検討しながら、品種育成を進めているところである。そこで、本講演では、小麦系統の選抜過程で明らかになった加工適性とグルテニン遺伝子構成との関係についての研究結果を紹介する。

１．グルテニン遺伝子構成とパンの加工適性

北海道のパン用主力品種「ゆめちから」が持つ超強力的な特性は高分子量側と低分子量側でどちらも生地物性を強くする遺伝子を持つことによって生じるが、超強力小麦の中でも遺伝子によって適する用途が異なる。*Glu-D1d* と *Glu-B3ab* を併せ持つものは通常の強力小麦（*Glu-B3h* をもつ「１CW」や「春よ恋」など）に比べると生地物性が強く、生地の伸びが悪いが、比較的良好な製パン適性を持つ。これに対し、*Glu-D1d* と *Glu-B3g* の組合せでは生地物性が過剰に強く、パン体積は低くなる傾向がある。

２．グルテニン遺伝子構成とパスタの加工適性

生地物性が過剰に強く、パン体積が低くなる *Glu-D1d* と *Glu-B3g* の組合せは、一方でパスタ用としては食感が硬くてゆでのびしにくい良好なパスタ適性を示す。

３．タンパク含有率の変動による品質の変動

小麦粉のタンパク質の含有率は様々な環境条件によって大きく変動し、それに伴って生地物性や加工適性も変動するが、変動の仕方には品種間差が認められる。

さらに本講演では、上記のような情報を元にした各用途に適した小麦系統の具体的な品種育成過程を紹介し、タンパク質含有率上昇に伴い生じる収量や外観品質の低下など現状で未解決のタンパク質をめぐる小麦品種育成上の課題についても触れたい。

breeding, wheat, glutenin

発表責任者：伊藤美環子（miwako@affrc.go.jp）

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ B05 会場

小麦粉生地物性とグルテニンマクロポリマーについて

Relationship between wheat dough propeties and Glutenin Macro Polymer

○野崎 聡美（（株）日清製粉グループ本社)
○Satomi Nozaki (Nisshin Seifun Goup Inc.)

小麦粉は、世界の多くの国々で様々な形に調理・加工され、主食として食されている。用途に応じて多様な小麦粉が販売されているが、製パンにはタンパク質の量が多く、粘弾性のバランスの良いグルテンを形成する小麦粉が適している。そして、製パン性の劣る小麦粉には、酵素などを加えることでパン生地の加工性やパンの品質を大幅に改善できることが知られており、それらの添加剤は製パン改良剤と呼ばれる。しかし、製パン性に関与する小麦粉の成分や、製パン改良剤の作用メカニズムについては解明されていない部分が多い。我々は、この未解明部分を明らかにするための分析指標として、GMP （Glutenin Macro Polymer)に着目した。GMP とは、小麦粉やパン生地中からアルカリによって抽出されるゲル状の凝集体であり、多糖類とタンパク質から成る複合体である。その物性や量・構成成分などが小麦粉の品質と関係があることが近年報告されている。

我々は、製パン性の異なる 2 種類の小麦粉、すなわち春小麦主体、および冬小麦主体の小麦粉について、GMP の挙動を調べた。一般に、春小麦は冬小麦よりも製パン性に優れると言われている。これらの小麦粉から直捏法によりパン生地を調製し、工程中の 3 箇所（ミキシング後、一次発酵後、ホイロ後）にて採取した生地から GMP を抽出した。GMP の抽出量、粒子形状、および GMP を構成する糖の鎖長は、製パン工程において一定の規則性をもって変化し、春小麦と冬小麦の間には差異があることを確認した。特に、ホイロ後における GMP 量と糖鎖長に大きな違いが見られ、生地物性（伸展性および生地強度）の違いと照合することで、GMP の分析値とパンの加工適性を関連付けた。

更に、製パン改良剤の一例として、酵素製剤（ヘミセルラーゼ）を冬小麦主体の小麦粉に添加した場合の GMP と生地物性の変化を調べた。ヘミセルラーゼ添加により冬小麦の GMP の性状が、春小麦に近づくことを確認でき、GMP を指標に酵素製剤の製パン改良効果を評価できる可能性があることを明らかにした。

本講演では、GMP の性状と生地物性についての研究結果を分析例とともに紹介する。

glutenin macro polymer, wheat, dough properties

発表責任者：野崎　聡美（nozaki.satomi@nisshin.com）

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ B05 会場

グリアジン凝集体のナノ構造と物性

Relationship between nanostructures and rheological properties of gliadin aggregates

○裏出 令子[1]、佐藤 信浩[2]、杉山 正明[2] ([1]京大院農、[2]京大原子炉)
○Reiko Urade[1], Nobuhiro Sato[2], Masaaki Sugiyama[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. RRI)

グリアジンは、1819 年に G. Taddei によりアルコール水に溶解するグルテンタンパク質として同定された代表的なプロラミンである。小麦粉生地中で水和したグリアジンは水素結合や疎水性相互作用などの分子間力を介して凝集し、グルテニンが形成しているネットワークの隙間を埋めるフィーラーとしてグルテンに粘性と伸展性を付与する。一般にタンパク質のような高分子化合物が特徴的な物性や機能をもつのは、凝集体構造に依存した動的性質を発揮することによる。したがって、グリアジンの凝集体構造の形成メカニズムを解明することにより、グリアジンに特有の物性の発現機構を明らかにすることができる。しかし、グリアジンは中性の緩衝液には不溶性であるため、通常のタンパク質を研究する方法で解析することが困難である。そのため、ほとんどの研究は 70%エタノールのようなタンパク質を変性させる溶媒やタンパク質の荷電状態を変化させる希酸で抽出し、同様の溶媒中で構造の研究が行われてきた。最近、わたくしたちはグリアジンをアルコールや変性剤を用いずに塩化ナトリウムを含む小麦粉生地から抽出する方法を開発した。これにより、グリアジンは純水に高濃度で溶解するタンパク質であることが明らかになるとともに、未変性のグリアジンの解析が可能となった。さらに、結晶化が難しいタンパク質の溶液中における構造や、濃厚なタンパク質凝集体のナノスケール構造の解析に威力を発揮する量子ビーム(X 線および中性子)タンパク質溶液散乱(SAXS および SANS)をグリアジン水和物の凝集体構造の解析に導入し、検討を行ってきた。本シンポジウムでは、未変性グリアジンの SAXS および SANS 解析により明らかとなった水中での大きさ、形および会合状態とともに、水和した濃厚状態のグリアジンが形成するナノスケール階層構造を紹介する。また、SAXS 解析で見えてきた塩化ナトリウムによる水和グリアジンのナノスケール凝集体構造の変化と物性との関係についても最新の知見を紹介する。パンやうどんなどの小麦粉生地の加工において塩化ナトリウムは抗張力や伸展性を増強させ、粘着性の低下をもたらすなどグルテンの物性調節に重要な役割を果たしている。水和グルテンタンパク質の動的粘弾性などの物性解析から、塩化ナトリウムのグルテン物性への効果はグリアジンへの作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、凝集体構造を基軸としたそのメカニズムの解明は食品加工技術を発展させていく上できわめて重要であると考えている。

gliadins, nanostructures, small-angle X-ray scattering

発表責任者：裏出　令子（urade@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ B05 会場

小麦タンパク質の抗肝炎・抗炎症作用

Hepatoprotective and Anti-inflammatory Effects of Wheat Protein

○江頭 祐嘉合（千葉大院・園芸）
○Yukari Egashira (Chiba Univ.)

小麦タンパク質グルテンは小麦粉に強い粘弾性を与えるという他のタンパク質にはない特長を有する。一方、小麦グルテンは栄養学的にL-リシンとL-スレオニンが少ないため、成長期のラットに投与すると動物性タンパク質に比べて体重の増加が抑制される。しかし、小麦グルテンの構成アミノ酸の約 4 割を占めるL-グルタミンは、非必須アミノ酸ではあるがタンパク質の構成要素やエネルギー源になる以外に、動物細胞培養液の必須成分でもあり、医療現場において消化管手術後の回復促進のために使用されるなど様々な働きをもつ。そこで、われわれは小麦グルテンの未知の機能を検討し、小麦グルテンがある種の炎症を抑制する働きがあることやその作用機序の一部を明らかにしてきた。

食品の機能性を評価する手法のひとつにラットを用いたD-ガラクトサミン（GalN）肝炎のモデルの系が知られている。このモデルは肝臓の病理組織学的、生化学的所見がヒトのB型肝炎に類似している為、医学、薬学、栄養学分野で肝炎の治療や予防目的の研究に広く用いられている。GalNによる肝炎誘発メカニズムのひとつに腸管バリア機能の破壊が知られている。これにより大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁に存在するリポ多糖（LPS）が腸管を通過して肝臓のマクロファージ系細胞であるクッパー細胞を刺激し炎症性サイトカインTNFαやIL-18などを介した肝細胞の炎症を誘導する。それに伴う活性酸素種の発生により肝細胞にアポトーシス、ネクローシスを引き起こす。そのため、この系は肝炎のみならず他の炎症抑制の評価にも繋がると考えられる。そこでわれわれは小麦グルテンをはじめとする各種たんぱく質を 14 日間ラットに投与した後に、GalNを腹腔内投与した。その結果、小麦グルテンがラットの AST、ALT 活性を強く抑制し、肝炎を抑制することを示した。一方、トウモロコシのタンパク質ツェイン、卵白タンパク質、大豆タンパク質、ミルクカゼインにはそのような作用は認められなかった。小麦グルテンは消化管内でペプチドやアミノ酸にまで分解されて吸収される。そのため、次に小麦グルテンの加水分解物、ペプチド、小麦グルテンに含まれる主要なアミノ酸をラットに投与し、あるいはマクロファージ細胞に添加して、抗肝炎、抗炎症作用やその作用機序について検討した。その結果、小麦グルテン加水分解物であるピログルタミルロイシンとL-グルタミンが同様の効果を示した。その作用機序としてNFκB経路の抑制およびMitogen-activated protein kinases (MAPK)経路のJNK、ERK、P38MAPKのリン酸化を抑制することにより抗炎症作用を示すことを明らかにした。本シンポジウムでは小麦グルテンの機能性を中心に、グルテン由来のペプチド、アミノ酸も含めた炎症抑制機能やメカニズムについて紹介する。

Wheat gluten, Inflammation, Pyroglutamyl peptides

発表責任者：江頭　祐嘉合（egashira@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4SY04-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:15～ B05 会場

脱アミド化が小麦タンパク質の特性およびアレルゲン性に及ぼす影響

Effect of deamidation on properties and allergenicity of wheat protein

○熊谷 日登美（日大生資科）
○Hitomi Kumagai (Nihon Univ.)

グリアジンは伸展性を有し、さらにグルテニンと共存し、グルテンを形成することにより粘弾性を示す。この独特の物性が、パン、ケーキなどの膨化食品やうどんなどのコシのある麺類の製造を可能にしているが、その一方で、泡立ち性や乳化性などの界面活性はそれ程高くない。我々は、カルボキシレートタイプの陽イオン交換樹脂とタンパク質溶液を混合することにより、タンパク質を構成しているグルタミン残基やアスパラギン残基をグルタミン酸残基やアスパラギン酸残基に変換（脱アミド化）できることを見出した。脱アミド化は、通常、塩酸を用いるが、塩酸ではペプチド結合の加水分解も起こり、加工特性や嗜好特性が低下する。また、グルタミナーゼの場合は、グルタミン残基にしか反応せず、アスパラギン残基の脱アミド化は難しい上、酵素は一般的には高価である。陽イオン交換樹脂による脱アミド化反応は、ペプチド結合の加水分解を起こさず、また、アスパラギン残基にも反応する。樹脂は再生可能であるので、繰り返しの使用によりコストも削減できる。さらに、本反応は 60%エタノール溶液中でも起こり、エタノール可溶性タンパク質の脱アミド化も可能である。本講演では、グルテンから 60%エタノールでグリアジンを抽出し、陽イオン交換樹脂と混合することにより得られた脱アミド化グリアジンの特性とアレルゲン性についての研究成果を紹介する。

１．グリアジンの脱アミド化による泡立ち性･溶解性・消化性の向上

脱アミド化により、通常、タンパク質の親水性–疎水性バランスが変化し、乳化性や泡立ち性が向上する。界面活性の向上は膨化特性の改善につながることが期待できるので、泡立ち性の測定行った。また、グリアジンの水や塩化ナトリウム溶液に対する溶解性および *in vivo* での消化性についても評価した。

２．グリアジンの脱アミド化によるアレルゲン性の低下

グリアジンは小麦の主アレルゲンであり、そのエピトープ構造にはグルタミンの連続配列が含まれることが知られている。そこで、脱アミド化グリアジンはアレルゲン性が低いと考え、小麦アレルギー患者血清に対する反応性、および、小麦アレルギーモデルラットに脱アミド化グリアジンを経口摂取させることによるアレルゲン性および経口免疫寛容誘導能の評価を行った。

脱アミド化グリアジンは、泡立ち性、水や塩溶液に対する溶解性、消化性が高く、摂取した際にアレルギー症状が出にくいことが明らかとなった。これらの研究成果が、おいしく、かつ、アレルゲン性の低いパンやケーキなどの小麦製品の作製につながることを期待している。

wheat gliadin, deamidation, allergenicity

発表責任者：熊谷 日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B06 会場

糖鎖や糖類を介した微生物と高等動物の相互作用

Carbohydrate-mediated interactions between microbial and higher animal cells

○竹川 薫 (九州大院農)
○Kaoru Takegawa (Kyushu Univ.)

微生物と高等動物が、まず最初に接触する際には、細胞表層の糖鎖は細胞間認識や感染のマーカーとして最も重要な役割を果たしている。例えば、ヒトの体内に微生物が体内に侵入して来た際には、ヒトの C 型レクチンや Toll 様レセプターなどのセンサーにより、微生物の細胞壁や細胞表層糖鎖が認識され、最終的には自然免疫系が活性化して、サイトカインなどの発現が誘導される。このように高等動物と微生物の糖鎖を介した相互作用を研究することは、病原菌の感染機構や腸内細菌の宿主との共生機構の解明に重要である。一方、微生物とヒトの相互作用機構に重要な糖鎖や糖類を利用すれば、新たな薬剤や健康食品などへ適用可能であることも示唆されている。
本シンポジウムでは、微生物と高等動物との相互作用分子の中で、特に「糖質」に着目した。この微生物とヒトの間のコミュニケーションに重要な糖質や、糖鎖の認識メカニズムを明らかにして、得られた知見を人の健康増進に役立てることができないかと考えている。具体的には、腸内細菌と宿主であるヒトとの糖鎖を介した共生機構の解析と利用、オリゴ糖酵素合成技術の開発と評価基盤の確立、酢酸菌の生産する希少糖類の産業利用､バクテリアの LPS を利用した免疫活性化物質の産業利用など、糖鎖を介した微生物とヒト間の相互作用のメカニズムについて、さらに得られた知見をヒトの健康増進へどのようにして利用するか、最近の成果について紹介したい。

Interaction, Sugar chains

発表責任者：竹川　薫（takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ B06 会場

酢酸菌の生産する希少糖類の利用

Application of rare mono-saccharides produced by acetic acid bacteria.

○竹下 圭（株式会社伏見製薬所）
○Kei Takeshita (Fushimi Fharmaceutical Co., Ltd.)

酢酸菌は、その存在が確認されるずっと以前から、食酢やナタデココの製造などに使用されてきた重要で身近な微生物である。本シンポジウムに関係する糖質では、ビタミン C 合成の初発の工程において行われるソルボース発酵(D-ソルビトールから L-ソルボースへの酸化反応)で良く知られている。

自然界では、酢酸菌は果実や花の蜜、それらが腐敗したものの中に生息しており、その中に含まれる糖やアルコールを利用しながら生育している。糖やアルコールの利用には酢酸菌の行う「酸化反応・酸化発酵」が伴っており、糖やアルコールが糖酸や有機酸へ変換される反応が培地中で行われている。酢酸菌がこのような「酸化反応」を行う理由は、糖類を(1)直接的に炭素源、エネルギー源として利用する、(2)他の微生物が利用しにくいような形にする、(3)酸性環境を作り出し、他の微生物が生育しにくくするなどが考えられる。このような酢酸菌の持つ強い酸化能力は多岐に渡っており、これまでも様々な物質生産に応用され、多くの報告がなされている。

私たちのこれまでの研究では、酢酸菌のこのユニークな能力を利用した様々な希少単糖類の生産方法の確立を目指して検討を行ってきた。その研究過程で、D-ソルビトールを原料として酢酸菌(*Gluconobacter*)を使用した 2 段階の酸化発酵で生産される 5-ケト-D-フルクトース（5-KF）や L-ソルボースおよび、その誘導体が産業上有用な抗菌活性を示すことを見出したので紹介する。

5-KF は自然界に広く存在する糖アルコールである D-ソルビトール、D-マンニトールからそれぞれ L-ソルボース、D-フルクトースを経て産生されることが知られている。その構造は L-ソルボースまたは D-フルクトースの 5 位の水酸基が酸化されたものである。5-KF の細菌による資化性や添加による生育への影響を調べたところ、多くの細菌に対して高い抗菌活性を示すことが明らかとなった。生育抑制が確認された細菌には、多剤耐性が問題となっている黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、歯周病原因菌（*Fusobacteium nucleatum*）などが含まれており、化粧品、医薬品、医薬部外品などに利用可能であることが示唆された。また、L-ソルボースの誘導体（ソルボシド）についても同様の試験を行ったところ、5-KF とは異なる抗菌活性が確認された。ソルボシドの抗菌活性は、例えばニキビ菌（*Propionibacterium acnes*）や加齢臭原因菌（*Corynebacterium striatum*）などの皮膚に病原性を示す菌に特異的に作用する選択的なものであり、これまで知られていない特徴的な抗菌性を示すことがわかった。本シンポジウムでは、これらの抗菌活性を有する単糖類の利用について紹介したい。

rare mono-saccharides, antibiotics, *Gluconobacter*

発表責任者：竹下圭（takeshita@fushimi.co.jp）

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:10～ B06 会場

食品の新しい機能性素材としての LPS（リポポリサッカライド）の有用性

LPS (lipopolysaccharide), a new useful food substance to keep in health

○稲川 裕之 [1,2,3] ([1] 香川大医、[2] 新潟薬科大、[3] 自然免疫技組)
○Hiroyuki Inagawa[1,2,3] ([1]Kagawa Univ., [2]NUPALS, [3]Cont. Innate Immun. TRA)

現代社会で問題になっている生活習慣（食事の不摂生や、運動不足、慢性的ストレス）は生体内に種々の異物（酸化 LDL、最終糖化産物、変性タンパク質等）を蓄積させ、慢性炎症を誘導し、生活習慣病（動脈硬化症、糖尿病等）を引き起こす。我々はこれまで植物共生グラム陰性菌に由来するリポポリサッカライド(LPS)の経口・経皮摂取は生体の異物排除能、組織修復能を高め、生活習慣病予防につながる健康維持に有用な効果を持つことを見出してきた。LPS はこれまで医薬の世界では静脈注射すると全身性に誘導される炎症や細胞レベルでのサイトカイン産生を指標として起炎物質として取り扱われてきたが、細菌から提供される極めて利用しやすい情報分子として紐解くと、食品の機能性成分としての有用性が見えてくる。
一般の食用植物に含まれる LPS 量は、生薬や健康食品（青汁)、穀類等には比較的多く、乾燥重量 1g あたり 0.1～数十μg になる。これらの LPS は植物に共生しているグラム陰性菌に由来すると考えられる。また、発酵食品に利用されているグラム陰性菌としては酢酸菌、ザイモモナス、キサントモナス、パントエア菌などが製造過程の一翼を担っているなど、ヒトは意識せずに食品を経由して相当量の LPS を経口的に摂取している。
経口摂取された LPS は小腸でパネート細胞に働き抗菌ペプチドを誘導し、腸内細菌叢の安定化に寄与する。一方、抗生物質の摂取は腸内細菌叢の dysbiosis を引き起こしバクテロイデスなどのグラム陰性菌を減少させて LPS 不足を引き起こし、感染防除能の低下やバクテリアルトランスロケーションが増加することが知られている。我々はパントエア菌 LPS の経口投与が腹腔マクロファージの貪食能を高めることやアルツハイマー病モデルマウスの認知機能を予防することを見出している。すなわち、LPS は経粘膜的に環境から摂取されることが健康維持に働く生理的な経路であると考えられる。
LPS の多い食品としての例として主食になるコメを紹介する。玄米を精米していく過程で LPS 量が低下していくが、コメのデンプン層の外側に存在する亜糊粉層には精白米の 20 倍の LPS が含まれている。0.5%の亜糊粉層を添加した飼料をマウスに摂取させると、腹腔マクロファージの貪食能が増強されること、スギ花粉症モデルの発症を有意に抑制する。また、玄米には白米の 100 倍程度の LPS が含まれ、容易に LPS を摂取期待出来る食品である。
謝辞：本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：農研機構　生研センター）によって実施された。

Innate immunity, Macrophages, Lipopolysaccharide

発表責任者：稲川裕之（pina@shizenmeneki.org）

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ B06 会場

機能性オリゴ糖の創出を目指したオリゴ糖ライブラリーの構築

Construction of oligosaccharide library aiming at the creation of functional oligosaccharide

○中井 博之（新潟大農）
○Hiroyuki Nakai (Niigata Univ.)

現在、我が国を含む国際的な高齢化や生活習慣病の罹患率上昇に伴い、ヒトの健康保持増進の重要性が高まっており、食品には栄養面や嗜好面だけでなく、ヒトの生体調節機能が求められている。生体調節機能をもつ食品素材としてオリゴ糖が挙げられ、日本では腸内細菌叢改善作用など科学的根拠に基づいた生理活性を有する「特定保健用食品」として国民に広く認知されているものもある。また、構成糖や結合様式が異なる多種多様なオリゴ糖には、それぞれに対応した独自の機能性が期待される一方、大量調製技術の確立の困難さから機能性評価試験の実施、産業的利用が限られており、オリゴ糖がもつ多様な特性を人類は活かしきれていない。当該問題の解決法として、我々は糖質加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）のオリゴ糖合成反応に注目した。ホスホリラーゼは、糖質のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解して糖 1-リン酸を生産する酵素であるが、本反応は可逆反応であり、加リン酸分解反応により生ずる糖供与体と糖受容体を出発材料とした際、逆反応によりオリゴ糖の合成が可能である。また、ホスホリラーゼ独自がもつ高い反応位置選択性を活かし、糖供与体と糖受容体の組み合わせにバリエーションを持たせることで、様々なオリゴ糖を選択的に生産できる。さらに、同一の糖 1-リン酸を生成するホスホリラーゼを組み合わせて用いることで、高価な糖 1-リン酸を調製することなく安価な天然糖質資源を出発原料とすることができ、元の糖質原料とは異なる結合を有するオリゴ糖の大量生産も可能である。近年我々は、様々な生物種のゲノム情報を活用したバイオインフォマティクス的手法や環境サンプルから回収される難培養性微生物由来遺伝子を対象としたメタジェノミクス解析による新規ホスホリラーゼ遺伝子スクリーニング技術を開発し、オリゴ糖生産に有用な新規ホスホリラーゼを複数発見している。その成果は澱粉・麦芽糖・蔗糖・セルロース分解物・キチン分解物など天然糖質資源を多種多様なオリゴ糖へ高収率変換する技術開発に繋がり、オリゴ糖ライブラリーが構築されつつある。これまでにライブラリー化したオリゴ糖の中には、腸内細菌叢改善作用や免疫賦活作用などヒトの健康保持増進に有益な生理活性を示すが、自然界での含有量の低さから大量調製が極めて困難であった希少オリゴ糖や新規なオリゴ糖が数多く含まれている。これらの研究成果は、生体調節機能を有するオリゴ糖「機能性オリゴ糖」を社会に安価に供給することを可能し、健康食品や医薬品素材などとしての用途拡大、植物性および水産系バイオマスの高度利用による環境負荷の低減、新たな食品・医薬品産業の創出や関連産業の活性化、ヒトの健康保持増進に寄与するものと期待される。今回は、上述した一連の研究成果を概説する。

oligosaccharide, phosphorylase

発表責任者：中井博之（nakai@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:20～ B06 会場

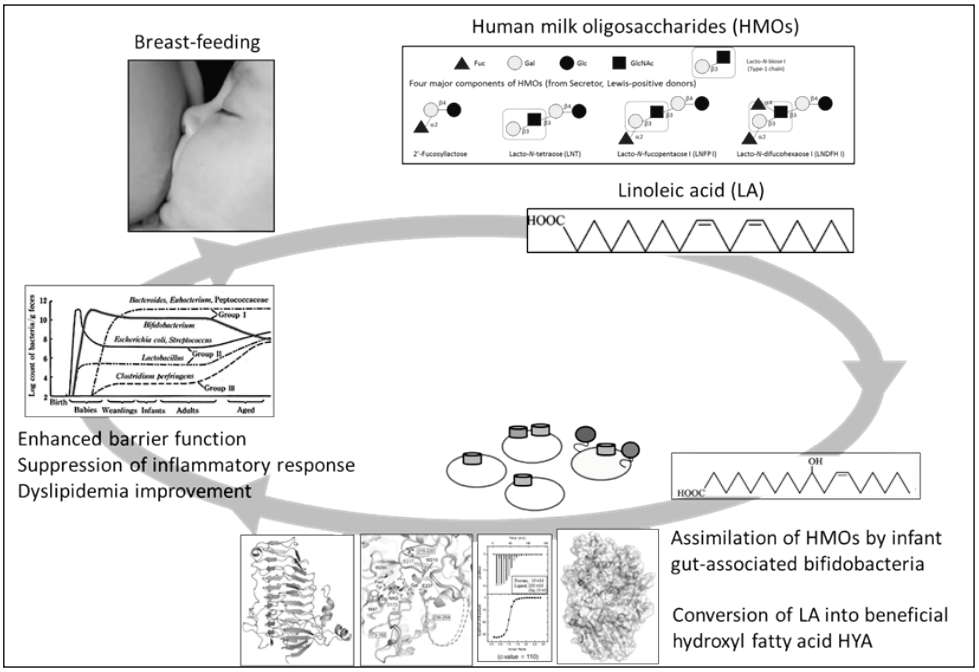
母乳成分を介したビフィズス菌とヒトの共生・共進化ー母乳オリゴ糖と HYA 仮説ー

Symbiosis and co-evolution between bifidobacteria and humans -Human milk oligosaccharides and HYA hypothesis-

○片山 高嶺[1]、後藤 愛那[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]（[1]京大院生命、[2]京大院農）
○Takane Katayama[1], Aina Gotoh[1], Shigenobu Kishino[2], Jun Ogawa[2] ([1]Grad Sch Bio, Kyoto Univ., [2]Grad Sch Agr, Kyoto Univ.)

母乳栄養児の腸管では、授乳を開始してから数週間以内にビフィズス菌優勢な腸内細菌叢（ビフィズスフローラ）が形成される。我々はここ 10 年程の間に、このビフィズスフローラ形成には人乳中に含まれる重合度 3 以上のオリゴ糖成分（ヒト母乳オリゴ糖）が関与していることを明らかとしてきた。母乳オリゴ糖は、乳糖と脂質に次いで 3 番目に多い固形成分として人乳に含まれているが、ヒト消化酵素には耐性であるために乳児の栄養とはならない。興味深いことに、ヒト乳児糞便から単離される多くのビフィズス菌は、ヒト母乳オリゴ糖に特化した資化経路を有しており、しかも、この経路上の酵素群は乳児型ビフィズス菌以外の腸内細菌にはほとんど見られない。また乳児糞便 DNA の遺伝子解析を行うと、母乳オリゴ糖資化遺伝子が実際の腸管において母乳オリゴ糖の存在による選択圧を受けていることが強く伺われる。すなわち、母乳オリゴ糖の機能の一つはビフィズス菌増殖作用であり、母親は乳児の腸内でビフィズス菌を増殖させるために、乳腺においてわざわざ多大なエネルギーを消費して母乳オリゴ糖を合成しているとも考えられる（理論上、糖 1 分子を付加するには ATP 1 分子が必要であり、母乳オリゴ糖は 10～20 g/L 程度含まれている）。では、なぜヒトはそこまでしてビフィズス菌を増やすという選択（進化）をしてきたのであろうか。

本シンポジウムでは、まず、母乳オリゴ糖を介したヒトとビフィズス菌の共生・共進化について我々の最新の知見を紹介すると共に、ビフィズスフローラ形成の生理的意義について、リノール酸の水和物 10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸（HYA）の観点から新しい仮説を提唱したい。



Bifidobacteria, Human milk oligosaccharides, 10-Hydroxy-cis-12-octadecenic acid

発表責任者：片山高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B07 会場

オルガノイドが切り拓く疾患生物学
The Evolving Roles of Organoids in Disease Biology

○佐藤 俊朗、股野 麻未、太田 悠木、高野 愛、下川 真理子（慶大医）
○Toshiro Sato, Mami Matano, Yuki Ohta, Ai Takano, Mariko Shimokawa (Keio Univ.)

腸管内は摂取した食餌とともに，おびただしい腸内細菌や有害な異物を包含し，腸管上皮により選択的な栄養素の吸収と体外異物の侵入阻止が行われている．このような過酷なインターフェースを一生涯保つために，腸管上皮は細胞増殖に特化した陰窩と短寿命の分化機能細胞から成る絨毛の２つのコンパートメントを構成している．さらに，陰窩底部には全ての分化細胞の源となる腸管上皮幹細胞が存在し，絶えず自己複製を繰り返している．このような精巧な制御機構の破綻は様々な消化器疾患の病態に結びつくと考えられてきたが，その機能解析は遺伝子改変マウス解析に制限されてきた．我々は，幹細胞ニッチを同定することにより，体外での腸管上皮組織の再構築に成功し，単一の幹細胞を永続的に培養することを可能にしたオルガノイド培養を開発した．オルガノイド培養はマウスのみならず，ヒトの疾患上皮細胞研究を可能にし，多数の患者由来消化器がんオルガノイドからなる疾患オルガノイドライブラリーが構築により，その複雑な遺伝学的基盤と細胞生物学的な変容の連関が明らかにされつつある．また，ゲノム編集技術の応用により，人工的な発がんプロセスの再現や病態の可視化技術が導入され，in vivo のスナップショット画像とは異なるダイナミックな疾患細胞生物学が創生された．本セミナーではオルガノイドの開発経緯からその応用研究まで，最新の知見とともに発表したい．

Organoids, Cancer, Stem Cells

発表責任者：佐藤俊朗（t.sato@keio.jp）

講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:45～ B07 会場

腸管オルガノイドを用いた microRNA の解析

Study on microRNA expression using intestinal organoids

○園山 慶（北大院農）
○Kei Sonoyama (Hokkaido Univ.)

microRNA（miRNA）は 22 塩基程度のノンコーディング RNA で、標的 mRNA の 3’非翻訳領域に対して相補性を示し、その mRNA の不安定化や翻訳抑制を介して遺伝子発現を調節することにより、さまざまな生命現象や疾患に関わっている。我々は、腸内細菌叢が宿主の生理に影響をおよぼすときに、循環血中に存在するエクソソームのカーゴである miRNA が関与する可能性について検討している。例えば、肥満マウスの脂肪細胞増大や脂肪組織炎症を抑制する乳酸菌株[1)]を投与したマウスの血清からエクソソームを分離し、別のマウスから分離した腹腔滲出細胞やマクロファージ細胞株の培地に添加したところ、LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生を抑制したが[2)]、このことにエクソソーム中の miRNA が関与するかもしれない。血中に存在するエクソソームは体内のさまざまな細胞が放出したものの総体である。我々は、エクソソームを放出する細胞として腸内細菌に直接曝露する腸上皮細胞に着目し、マウスの腸粘膜陰窩よりオルガノイドを作成して解析した。まず、miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイにより解析したところ、オルガノイドは分離した腸上皮細胞を概ね反映していた。分離した腸上皮細胞においては陰窩-絨毛軸に沿っていくつかの miRNA の発現レベルが異なっており、またそれらの miRNA はそれぞれの標的 mRNA の発現を制御していたので、陰窩-絨毛軸に沿った上皮細胞更新に miRNA が関与すると推察した。しかしながら、分離した陰窩からオルガノイドに発達する段階における miRNA および標的 mRNA の発現パターンは、陰窩-絨毛軸に沿った発現パターンとは異なっていた。これは、オルガノイドにおいて食品成分および腸内細菌叢などの管腔内因子ならびに内分泌/神経/免疫系の不在によるのかもしれない。さらに最近、腸内細菌叢の変化が腸上皮細胞の miRNA プロファイルにおよぼす影響について、分離した腸上皮細胞およびオルガノイドを用いた解析を進めており、その概要についても報告する。

1) Takemura *et al.* 2010 *Exp Biol Med*, Okubo *et al.* 2013 *BMFH*
2) Aoki-Yoshida *et al.* 2017 *BBRC*

microRNA, gut microbiota, exosome

発表責任者：園山　慶（ksnym@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ B07 会場

腸管オルガノイドの幹細胞機能に対する食品関連成分の影響

Effect of food-related components on the function of stem cells in enteroids

○服部 一夫、齋藤 由季、羽生 ひかる（東京農業大学応用生物科学部栄養科学科）
○Kazuo Hattori, Yuki Saito, Hikaru Hanyu (Tokyo University of Agriculture)

2009 年に、腸管幹細胞の三次元培養系（オルガノイド培養系）が確立[1]されて以来、これまで困難であった腸管幹細胞に対する様々な因子の影響を *in vitro* で解析することが可能となった。我々は本培養系を用いて、食品に関連した成分が腸管の幹細胞機能に及ぼす影響について注目している、本シンポジウムでは、腸管の幹細胞機能に対するアミノ酸の影響[2] について紹介したい。アミノ酸は培地中にも含まれているため、アミノ酸の影響はアミノ酸欠乏培地の系で評価した。まず、20 種類のアミノ酸をそれぞれ 1 つだけ欠乏させた培地を用いて、腸管オルガノイドの増殖（BrdU assay）について調べた。24 時間欠乏させた結果、メチオニン（Met）欠乏培地において、腸管オルガノイドの増殖が最も低下していた。また、経時的な変化を調べたところ、3 時間の Met 欠乏から増殖の低下が認められた。さらに、Met 欠乏培地で 12 時間培養した後に Met を添加して 6 時間培養したときの増殖を調べたところ、増殖の低下がキャンセルされた。以上のことから、Met は腸管オルガノイドの増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。次に、どの細胞が影響を受けているのかを調べるために、Met 欠乏下で腸管細胞マーカーの mRNA レベルの経時的変化を調べた。その結果、Lgr5（幹細胞マーカー）の mRNA レベルが有意に低下し、内分泌細胞、K 細胞、腸クロム親和性細胞、杯細胞、パネート細胞のマーカーの mRNA レベルは有意に増加していた。このことから、Met 欠乏は幹細胞を減少し、分化した細胞を増加させる可能性が示唆された。さらに、Lgr5-EGFP マウスから調製したオルガノイドを用いて、幹細胞に対する Met 欠乏の影響を調べた。その結果、24 時間の Met 欠乏により Lgr5-EGFP の蛍光強度は減弱していた。また、Met24 時間欠乏させた後、Chromogranin A（内分泌細胞マーカー）に対する蛍光免疫染色を行ったところ、Met 欠乏は内分泌細胞の増加を誘導することが示された。以上より、Met は腸管オルガノイドの幹細胞の維持や分化に影響を与えることが示唆された。本結果は、腸管オルガノイドを用いることにより、幹細胞の機能に対する食品成分の影響を評価できる可能性を示すものであり、新たな食品の機能性への展開が期待される。また、我々は食品成分だけでなく、食品に混入する有毒物質の毒性評価にも腸管オルガノイドを利用できると考え、トリコテセン系カビ毒であるデオキシニバレノールなどを用いて、腸管幹細胞への影響についても検討している。その研究の一部もあわせて紹介したい。

1) Sato et al. Nature 459, 262-5 (2009)
2) Saito Y et al. Biochem Biophys Res Commun 488, 171-6 (2017)

enteroids, stem cells, methionine

発表責任者：服部一夫（k2kobaya@nodai.ac.jp）

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:25～ B07 会場

Enteroid を用いた Paneth 細胞が制御する腸内環境の機能解明

Elucidation of the intestinal environment regulated by Paneth cells using enteroid

○中村 公則、横井 友樹、米田 司、綾部 時芳（北大生命）
○Kiminori Nakamura, Yuki Yokoi, Tukasa Yoneda, Tokiyoshi Ayabe (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】 腸上皮細胞は病原体をすばやく排除する一方、たえず曝される食成分や共生細菌を選択的に感知することで腸内環境の恒常性を維持している。腸上皮細胞の一系統であるPaneth細胞は、小腸陰窩基底部に位置し抗菌ペプチドα-defensinを産生・分泌する。われわれは、マウスα-defensinであるcryptdinは病原菌を強く殺菌するが、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず、その選択性によって腸内細菌叢を制御することを明らかにしてきた。また、移植片対宿主病モデルマウスではPaneth細胞が障害されcryptdin分泌が著しく低下し、菌交代現象で感染死に至ることや、腸炎モデルIL10欠損マウスではcryptdin分泌が著しく低下することを報告した。近年、腸内細菌叢の構成異常と炎症性腸疾患、肥満症、癌など様々な疾病との関与が知られてきており、Paneth細胞の分泌機能が疾病と深く関わることが推測されるが、顆粒分泌の機序はいまだ不明である。一方、腸管機能解析においてPaneth細胞を含む小腸上皮細胞で構成される3次元構造体enteroidが注目されている。しかし、enteroidは内腔が閉鎖されており、Paneth細胞と腸内常在細菌や病原菌との相互作用解析が困難である。そこで本研究は、マイクロインジェクション法を応用して任意物質をenteroid内腔へ導入することでPaneth細胞の顆粒分泌を可視化および定量化する評価系を確立し、菌体成分等の腸内環境リガンドによる顆粒分泌応答機序を明らかにすることを目的とした。**【方法】**C57BL/6マウスの空腸組織を摘出し、EDTA含有培地中で振動を加えて得た小腸陰窩画分をMatrigelで包埋し、EGF、Noggin、R-spondin1を含む培地にてenteroidを培養した。グラム陰性菌の外膜構成成分（LPS）および *S. enterica* serovar Typhimurium（Salmonella）等をenteroid内腔にマイクロインジェクションにて導入刺激したPaneth細胞顆粒分泌反応について、共焦点レーザー顕微鏡を用いてtime-lapse観察および定量解析を行った。**【結果】**蛍光色素をenteroid内腔にマイクロインジェクションしたところ、内腔より培地中に漏れることなく導入が可能であった。次に、LPSを導入したところ、直後よりPaneth細胞の顆粒分泌が開始し、分泌前後における顆粒部分の面積を測定すると顆粒分泌率はLPS濃度依存的に増加した。さらに、Salmonellaを導入したところ数分後よりPaneth細胞の顆粒分泌がみられた。本研究により確立されたenteroid内腔へのマイクロインジェクションによるPaneth細胞の顆粒分泌評価系により、細菌の直接刺激による顆粒分泌を可視化し、定量することができた。腸内環境に関わる諸因子に対するPaneth細胞の分泌機構を解析することで、α-defensinによる腸内細菌叢形成と恒常性維持のメカニズムに迫り、関連する疾患の予防法や治療法の開発につなげたい。

Paneth cell, α-defensin, enteroid

発表責任者：中村公則（kiminori@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ B07 会場

霊長類の味蕾オルガノイドの作製とその解析
Generation and characterization of taste organoids from primates
○岩槻 健（東農大）
○Ken Iwatsuki (Tokyo Univ. Agri.)

味細胞は 10～14 日で再生を繰り返す細胞である。新たに生ずる細胞は常に味蕾周辺の味幹細胞から生じ、5 種類の味質（甘味、うま味、苦味、塩味、酸味）に反応する味細胞へ分化する。我々はこれまでに、げっ歯類の味蕾周辺に存在する Lgr5-EGFP 陽性細胞が味蕾の幹細胞・前駆細胞であること、同細胞が in vitro にて三次元培養できることを報告し、この味幹細胞の in vitro 培養細胞を味蕾オルガノイドと命名した。さらに最近、霊長類より味蕾オルガノイを作製することに成功し、その性質について解析したので本シンポジウムにて報告する。

味蕾オルガノイドは、生体内の味細胞と同様に、再生と分化を繰り返す細胞の集合体として存在する。同オルガノイドは、様々な呈味物質に反応することが分かり、客観的に味や美味しさを測定する“味覚センサー”としての利用が期待されている。しかしながら、これまでげっ歯類由来の味蕾オルガノイドしか作製されていない。最近の研究からげっ歯類とヒトの味覚は異なることが明らかとなり、ヒトを対象とした調味料や食品の開発のモデル動物としてげっ歯類はふさわしくないことが明らかとなっている。そこで我々は京都大学霊長類研究所と共同研究体制を敷き、霊長類からの味蕾オルガノイド作製を試みた。霊長類から作製した味蕾オルガノイドは、球体構造をとりながら増殖する。腸管から作製したオルガノイドとは異なり、中空構造は見られなかった。同オルガノイドは繰り返し継代し、凍結保存することが可能であり、保存や輸送などは通常の培養細胞と同様に扱えることがわかった。味細胞のマーカー発現を調べたところ、増殖マーカーの他、味覚受容体および味覚受容関連分子など成熟味細胞のマーカーが確認された。どちらのマーカーも、半年以上継代しても発現していることから、長期間安定して培養ができることが分かった。げっ歯類の味蕾オルガノイドと同様に味物質に反応することが予想されるため、現在カルシウムイメージングにより、種々の呈味物質への応答を調べている。

今後、霊長類味蕾オルガノイドの研究が進めば、新規呈味物質のスクリーニングや調味料の開発、更には味覚感度が低下した高齢者に向けた再生医療用の基盤技術確立にも同オルガノイドを利用できると考えられ、研究の発展が期待される。

taste cell, stem cell, organoid

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ B07 会場

次世代オルガノイド研究の展望
The era of Organoid Medicine

○武部 貴則[1,2] ([1]横浜市大医、[2]シンシナティ小児病院)
○Takanori Takebe[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]Cincinnati Children's)

多能性幹細胞（ES, iPS細胞）や、生検サンプルを活用したプライマリ細胞などを活用し、ヒト器官に類似した組織体を生み出すオルガノイド（Organoid）研究が隆盛を極めている。即ち、ヒトオルガノイドは解剖学的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示すことから、これまで研究対象とすることが困難であったヒトにおける様々な生命現象に迫ることが可能となった。

オルガノイドの人為創出が可能となった歴史的背景には，この100年の間に生じた3つの技術的ブレークスルーがある。第１（Organoid1.0）に，ばらばらに単細胞化された細胞の「再凝集技術」、第２（Organoid2.0）に， オルガノイド形成を促進する「基底膜マトリクス」の発見・利用である。そして、第３に（Organoid3.0）に，「幹細胞操作技術」の進展がある。さまざまなヒト幹細胞を自在に扱うことが可能となったことが、オルガノイド研究の大きな後押しとなった。特に、オルガノイド3.0時代を牽引してきたのは、故・笹井博士らを筆頭にわが国のトップ研究者であることは特筆すべきと言える。

本講演では、ヒト肝臓を対象としたオルガノイド研究を事例として、「どう創るか？」から「どう使うか？」へと力点が移りつつ有る第４世代のOrganoid4.0研究が指向する未来を考察したい。即ち、ゲノム編集、１細胞解析、物理解析、4Dイメージング技術など、異分野における革新技術を統合することによる臨床医学への実質的還元を目指す新潮流、オルガノイド医学（Organoid Medicine）研究の最前線を紹介する。

iPS cell, Organoid, Liver

発表責任者：武部貴則（Takanori.Takebe@cchmc.org）

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ B08 会場

分裂酵母の経時寿命を延ばす遺伝子と変異株の解析

Characterization of long-lived genes and mutants in fission yeast

○饗場 浩文（名古屋大・創薬）
○Hirofumi Aiba (Nagoya Univ.)

寿命や老化の理解に、酵母は大きな役割を果たしてきた。我々は分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）をモデルとして、経時寿命の制御機構に関する解析を進めている。経時寿命とは、分裂を停止した細胞が生存する期間として定義され、脳神経や心筋細胞など細胞分裂を終えた細胞の寿命を理解するモデルになると考えられる。分裂酵母の経時寿命は、細胞を回分培養して定常期に進入した時点から、経時的にコロニー形成率(CFU) を測定することで求めることができる。

これまでによく知られている普遍的な寿命延長（老化抑制）シグナルとして「カロリー制限（食餌制限)」がある。今回我々は、硫黄源の制限が分裂酵母の経時寿命を延ばす新たなシグナルであることを見出した。硫黄源の制限により、細胞サイズが小さくなると共に、リボソームタンパク質遺伝子の発現が低下した。他方、胞子形成能は上昇した。加えて、硫黄源の制限によるこれらの細胞応答は、Ecl1 ファミリー遺伝子に依存することがわかった。Ecl1 ファミリー遺伝子とは、高発現することにより、分裂酵母の経時寿命を延長させる因子として当研究室で取得されたもので、*ecl1*$^{+}$, *ecl2*$^{+}$, *ecl3*$^{+}$の 3 つの相同な遺伝子からなる。これらは、機能的に重複して働く亜鉛結合タンパク質であることが示されている。なお Ecl1 ファミリー様のタンパク質は、酵母、カビなどの真菌類に見出される。

Ecl1 ファミリー遺伝子のうち *ecl2*$^{+}$は、熱ストレスにより誘導される。他方、*ecl1*$^{+}$は、対数増殖期から定常期に移行する際、一過的に発現が上昇するが、その具体的機構は不明であった。今回、我々は上記 *ecl1*$^{+}$の一過的発現上昇が、硫黄源の制限がシグナルとなって起こること、この発現誘導に転写因子 Zip1 が関与することを見出した。加えて、硫黄源を制限すると経時寿命が延びることを見出した。

カロリー制限、硫黄制限が共に経時寿命を延ばすことから、これらに共通する細胞内変化を解析したところ、リボソーム関連タンパク質の発現低下が認められた。そこで、リボソームの発現低下と寿命延長の関連を調べるため、リボソーム遺伝子の欠失株ならびにリボソーム生合成を阻害する薬剤処理をしたところ、寿命が延長することが認められた。したがって、リボソームの低下が寿命延長の原因であると考えられる。これらに基づき「寿命制御におけるリボソーム仮説」を提唱したい。

参考文献：Ohtsuka H. and Aiba H. Factors extending the chronological lifespan of yeast: Ecl1 family genes. (Review). FEMS Yeast Research (2017) https://doi.org/10.1093/femsyr/fox066

Ecl1 family, lifespan, yeast

発表責任者：饗場浩文（aiba@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ B08 会場

メチオニン代謝産物による寿命延長機構

Mechanism of lifespan regulation mediated by the methionine metabolits

○水沼 正樹（広島大・院先端研）
○Masaki Mizunuma (Hiroshima Univ.)

老化・寿命研究は、生物学的老化の仕組みを明らかにするのみならず、ヒトの老化を理解し、“健康寿命”の延長を実現するうえで極めて重要な課題である。老化過程は非常に複雑なプロセスであるが、その謎が遺伝子レベルでも理解されつつある。老化・寿命研究において、酵母、 線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのいわゆる真核モデル生物を用いて、寿命制御因子が同定され、老化の基本的な仕組みには共通点が多いことが明らかになった。モデル生物で保存された寿命制御経路として、TORC1(Target of Rapamycin Complex 1)や AMP 依存性プロテインキナーゼ(AMPK)経路が著名である。

出芽酵母には、「複製寿命」と「経時寿命」 という 2 つの寿命がある。複製寿命とは、 1 つの母細胞が一生の間に分裂できる回数を意味し、それには限りがあり、最終的には娘細胞を産むことができなくなる。つまり、母細胞が生じる娘細胞の数として定義される。また、経時寿命とは、栄養分を枯渇させたときに分裂しない細胞が生きたままでいる時間の長さである。この両者それぞれの寿命を測定することにより、酵母の老化を知ることができる。

私達は、出芽酵母を用いて解析から、メチオニン代謝系酵素の *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)水解酵素をコードしている *SAH1*(必須遺伝子)における変異株を取得した。興味深いことに、*sah1* 変異株は顕著に短命となった。そこで、*sah1* 変異株の短命を抑圧する変異株をスクリーニングすることにより、新規長寿遺伝子の取得を試みた。その結果、野生株よりも寿命が延長した変異株の取得に成功した(優性変異株を *SSG1* と命名)。そこで、*SSG1* 変異株の長寿メカニズムを解析したところ、*SSG1* 変異株は SAM 合成が促進され、酵母 AMPK である Snf1 の高活性が観察された。また、SAM 合成酵素過剰発現株においても Snf1 が活性化され、*SSG1* 変異株の寿命延長には Snf1 が重要であった。さらに、野生株に SAM を添加しても寿命に影響はなかったが、SAH を作用させると SAM の高蓄積と Snf1 の活性化及び寿命延長が観察された。本シンポジウムでは、酵母から明らかになった代謝産物による寿命制御機構を紹介したい。

yeast, lifespan, metabolite

発表責任者：水沼正樹（mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:55～ B08 会場

哺乳動物における視床下部神経を介した睡眠・老化・個体寿命の制御機構

Hypothalamic regulation of sleep, aging, and longevity in mammals

○佐藤 亜希子（長寿研中枢性老化・睡眠制御 PT）
○Akiko Satoh (National Center for Geriatrics and Gerontology)

近年、哺乳類の老化・寿命を制御する上で視床下部が上位中枢として機能していることが明らかになりつつある。我々は、哺乳類サーチュイン Sirt1 を脳特異的に高発現させたトランスジェニックマウス（BRASTO マウス）が有意に老化を遅延させ、個体寿命を延長することを見出した。また、BRASTO マウスは老齢になっても睡眠の質を維持していた。これらの作用は、視床下部 Sirt1、その結合相手である Nk2 homeobox transcription factor 1 (Nkx2-1)、そしてその下流標的遺伝子であるオレキシン２型受容体を含むシグナル伝達系により制御されている。さらに我々は、視床下部背内側核特異的に発現しており、Sirt1/Nkx2-1 制御系の下流標的遺伝子である PR domain containing factor 13 (Prdm13)が睡眠の質を維持する上で必須であることを見出した。Prdm13 発現量は加齢で低下するのに対して、カロリー制限及び長寿 BRASTO マウスで増加していた。これらの結果から、視床下部、特に背内側核には老化と睡眠の制御を結びつける共通機序があるのではないかと考えられた。本発表ではさらに、老齢マウスに認められる睡眠変化の分子メカニズムと、それがもたらす全身性の老化形質についても議論を進めたい。

Aging/longevity, Hypothalamus, Sleep homeostasis

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:25～ B08 会場

NAD 代謝による老化制御機構

Role of NAD metabolism in aging

○中川 崇（富山大医）
○Takashi Nakagawa (Univ. of Toyama)

NAD（Nicotinamide adenine dinucleotide）は様々な代謝経路に関与する補酵素であり、トリプトファンから合成される de novo 経路、ニコチン酸からの Preiss-Handler 経路、ならびにニコチンアミドからの salvage 経路から生合成される。特に、哺乳類ではニコチンアミドからの salvage 経路が重要であり、Nampt （Nicotinamide phosphoribosyltransferase）と Nmnat（Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase）という２つの酵素により、中間体の NMN（Nicotinamide mononucleotide）を経て、最終的に NAD が合成される。近年、NAD 依存性の脱アセチル化酵素 Sirtuin が、個体老化や寿命延長に深く関わっていることが明らかとなり、その制御因子としての NAD 代謝が注目を浴びている。例えば、老化に伴い組織内、細胞内の NAD レベルが減少するが、NAD 代謝を活性化することで、老化に伴う NAD レベルの減少を防ぎ、様々な抗老化作用を発揮することが数多く報告されている。しかしながら、NAD 自体は細胞透過性がないことから、実際の介入試験においては、NMN（Nicotinamide mononucleotide）や NR（Nicotinamide riboside）などの NAD 前駆体の投与が用いられている。実際に NMN や NR の投与は、マウスなどでは肥満や 2 型糖尿病、神経変性疾患などに対する治療・予防効果を持つことが報告されており、ヒトにおいても抗老化作用を検証する臨床試験が進められている。しかしながら、NMN や NR は高価であり、実際の応用には効率良く NAD レベルを上昇させる方法が望まれているが、前駆体取り込みから NAD 合成の経路についてはまだまだ不明な点も多く、NMN と NR のどちらが NAD 合成に有利なのかも議論のあるところである。そこで我々は、NAD 前駆体投与による NAD 合成経路の解明を目指し、NAD 関連代謝物を網羅的に測定できる NAD メタボロミクスを用いて、NAD 前駆体投与による NAD 合成経路の解析を行った。本シンポジウムでは、培養細胞を用いた NMN もしくは NR の取り込みの経時変化や中間代謝物の測定から分かった、NMN もしくは NR の代謝経路の違いや、抗老化戦略に与える影響などについて発表する。

NAD, aging, metabolism

発表責任者：中川崇（nakagawa@med.u-toyama.ac.jp）

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:55～ B08 会場

コエンザイム Q10 と老化

coenzyme Q10 and Aging

○川向 誠（島根大生資）
○Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

コエンザイムQ（CoQ、ユビキノン）はイソプレノイドキノンの一種で、原核生物から真核生物まで、広く生物界に分布している。イソプレノイド鎖長10を有するCoQ10は、サプリメントとして広く利用されており、抗老化作用も謳われている。コエンザイムQは、電子伝達系の成分としてエネルギー産生に関わる点と抗酸化物質としての役割が重要である。それらの役割以外にも硫化水素の生成に関与する機能など補酵素としての機能がある(1)。我々は分裂酵母（*S. pombe*）CoQの合成欠損株を、注意深く観察することにより、ミトコンドリア機能と寿命との関連性を強く意識しはじめた。CoQを合成できない分裂酵母ではエネルギー産生能は弱く、最小培地上での生育が著しく遅く、定常期での生存率（寿命）が著しく低下する(2)。一方、分裂酵母（*S. pombe*）のcAMP高生産株では細胞が伸張し、経時寿命は短く、逆に*pka1*破壊株では経時寿命は長い。cAMP-PKA経路はグルコースに依存して制御されるシグナル伝達系で、グルコースが枯渇すると経時寿命が低下する。このcAMP経路を欠損させた*S. pombe*ではCoQの合成量は上昇しており、ミトコンドリア機能は活発になる。カロリー制限で、電子伝達系を活発にさせた方が、老化を抑えられるという方向の考えと一致する。最近解析を進めている分裂酵母*S. japonicus*はCoQをほとんど合成しないという性質を示し、経時寿命は短い(3)。自然界でなぜこのように*S. japonicus*は代謝の方向性をシフトしたのかは、興味深い。

さらに、線虫の寿命が延びるとして発見された*clk-1*(*coq7*)変異株はCoQ合成に必須な遺伝子の変異体である。*coq7*遺伝子はCoQ生合成経路の最後から２番目のステップの酵素をコードしており、線虫の*clk-1(coq7)*変異株はDMQ（Demethoxy-CoQ）が蓄積する。この中間物質は呼吸鎖での機能が若干残っていることから、呼吸欠損にならずに、むしろ活性酸化の発生が抑制された状態であるため、寿命が延長しているという考え方がある。しかしながら、分裂酵母の*coq7*破壊株は経時寿命が低下しており、このことは、線虫の*coq7*変異体が長寿命である結果とは対照的である。

老化促進マウスSAMP1を用いた実験では、CoQ10の投与は、老化を抑制すると報告されており、CoQ10の投与が抗老化作用を示す１つの事例として知られている(4)。

(1) Kawamukai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 80:23-33 (2016)
(2) Miki *et al*. *FEBS J.,* 275: 5309-5324 (2008)
(3) Kaino *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* (*in press*)
(4) Tian *et al*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20:2606-2620 (2014)

coenzyme Q, aging, yeast

発表責任者：川向　誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4SY07-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:20～ B08 会場

血液と分裂酵母で共通する代謝物

Metabolites commonly present in human blood and fission yeast cell

○柳田 充弘（沖縄科学技術大学院大学）
○Mitsuhiro Yanagida (OIST Graduate Univ.)

DNA、RNA、タンパク質および低分子量代謝物（メタボライト）の包括的な解析は近年急速に進展した。われわれは長年真核生物染色体の分離・分配の研究をしてきて、下等真核生物と高等生物のメカニズムが高度に類似していることに感銘を受けた。近年、染色体分配機構も低分子メタボライトの影響を深く受けることが明らかとなり、メタボライトを通じた研究を発展させることに関心を抱くこととなった。長年研究対象としている分裂酵母 *S. pombe* 細胞のメタボライト組成を調べると約 130 種が同定・定量できる。酵母に特有のメタボライトも少数あったが多くは普遍的なものである。ヒト血液と比較すると 75%のメタボライトは共通であった。エネルギー源の ATP、抗酸化作用をもつグルタチオン、アミノ酸のグルタミンなどが分裂酵母、ヒト血液で共通して量的に最も多かった。メタボライト量の同定と定量には研究室の Pluskal 等が新規ソフトウエア MZmine2 を開発し現在最もよく利用されているものとなった。非分裂性の G0 期細胞の長い寿命がいかに保たれているかを理解するために変異体を用いた遺伝子研究とメタボローム解析を共に行っている。その結果、抗酸化活性をもつタンパク質やミトコンドリア内で起きる反応系の重要性が明白となった。またそれぞれ 100 種以下の 2 群の遺伝子機能が G0 期制御に重要であることも見いだした。われわれは研究をさらに拡大するためにヒト血液のメタボライトの包括的解析に着手した。そのために 80 才以上の高齢者と 30 才程度の若年者のメタボライト組成を定量した。血液は血漿と赤血球にも分離し赤血球に富むメタボライト中で老化にリンクする可能性のあるメタボライトも見いだせるように計画した。その結果、14 種のメタボライトが老化とリンクする可能性を見いだした。6 種類は赤血球に富んでいた。9 種類は高齢者で量が低下する傾向があった。また 5 種類は高齢者で増加する傾向があった。高齢者で低下するメタボライトは抗酸化、酸化還元、筋肉、運動能力と関わり、高齢者で増加するものは尿素サイクル関連など老廃物排出と関連するものが多かった。これら老化にリンクするメタボライトの過半数が酵母細胞中にも存在した。メタボライトの細胞内機能が確定すればこれらと老化との関連は今後追求しうる課題となろう。またヒト老化度を血液メタボライトという「分子群」の含量測定とリンクして研究することを可能にしたことで今後のバイオテクノロジーへの発展も期待できる。なお、メタボライト測定が迅速かつ安価にできるになるよう鋭意方法改善に努めている。また 14 種のみならず最近の研究から 40 種以上の老化とリンクするメタボライトを同定しそれらの研究も進めている。

metabolomics, human blood, aging

発表責任者：柳田充弘（yanagida@oist.jp）

講演番号：4SY08-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A01 会場

新規評価系を用いた美味しさの評価

Sensory evaluation instrument for analyzing comprehensive palatability

○中野 久美子（甲子園短大、龍谷大農）
○Kumiko Nakano (Koshien Junior College,Ryukoku Univ.)

食の多様化が著しい現代社会において、食に対するヒトの価値観や嗜好が多様化しおいしさの基準および要因は多種多様で複雑である。そして、おいしさは定義もあいまいである。しかしながら、どのぐらい総合的においしいかについては、食品のカテゴリーに関係なく、感覚的な割合で評価し比較することができる。

おいしさは、人生に楽しみを与え生活に彩りを与える感覚的なものでもあると同時に食の機能でもある。人間と食品の関係には、“生きる”という動物共通の目的だけではなく、“楽しむ”という側面がある。おいしさは五感による感覚やパッケージ、盛り付け、価格、情報、雰囲気や同伴者の有無等の摂食環境である外因性要素，身体的心理的状態等の摂食者の状態である内因性要素等が統合されている。これらの要素から、おいしさは摂取される料理や食品とそれを摂取する人間の関係性に存在するものであると考えられる。

食品に含まれるおいしさの要因と人間が持つおいしさの要因、そして食品とその食品を身体の中に摂取する人間との関係を整理し分析すると、不足している栄養成分を含む食品への欲求である生理、満足感や幸福感を継続したいという快楽追求の報酬効果、生活環境やライフスタイルに適応しながら育まれた食文化、過剰に多く依存したり振り回される傾向のある食情報の４つの要素が抽出される。おいしさの構成要素を抽出し分類した後、食品のおいしさを問う独自のプロファイル法を確立し、おいしさの要素でおいしさを再構成する重回帰分析による評価モデルを構築した。このモデルを用いて様々な食品のおいしさを評価分析し、構成要素による総合的なおいしさへの影響の定量的表現やおいしさの数式化を検討している。

おいしさと、味覚や嗜好は同じような意味を表す言葉として使われている。しかしそれぞれ異なる概念である。味覚は人間の感覚をあらわす生理学的な用語であり、舌から脳への信号を伝える。嗜好は過去の食体験に基づいて好悪が判断されるシステムであり、好き嫌いを指しおいしさに影響を与える。食体験は年を重ね食経験によって更新されていく。好き嫌いの判断も不変ではなく経験を重ねることで変化していく。

おいしさは人間と食品との関係性にあり、食品を摂取した時の多様な要素を統合した判断であり、嗜好性の更新に寄与するものである。

palatability, evaluation, subdomain

発表責任者：中野　久美子（foodart380@gmail.com）

講演番号：4SY08-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A01 会場

「清酒」の肴とのおいしさ～新評価法の適用～

Evaluation of the comprehensive palatability of Japanese sake paired with dishes

○中村 諒[1,2] ([1]朝日酒造（株）、[2]龍谷大)
○Ryo Nakamura[1,2] ([1]Asahi Sake Brewing Co. Ltd., [2]Rukoku Univ.)

「おいしさ」は我々人間にとって、身近で基本的な快感でありながら、それ自身はまだ画一的な理解には至っていない。我々は食べ慣れた家庭の味においしさを感じたり、商品のラベルやそれに対するロコミによって、よりおいしく感じたりする。このように様々な要因が食品の嗜好・おいしさに影響を与える。Nakano らはそれらを生理、報酬効果（やみつき）、食文化、情報の４つの要素として捉え、これらの要素のうち、生理を除く３つの要素（報酬効果、食文化、情報）による総合的なおいしさの評価法を、チーズを用いて確立した[1)]。しかし、これまで本評価法が他の食品や飲料に適用可能であるかの報告はない。

一方、清酒ではこれまで分析型の官能評価法はすでに確立し、また、官能と化学物質の関連づけなども進んでおり、品質や清酒の特長評価などに広く用いられている。しかし、嗜好品である清酒の嗜好やおいしさに関する研究報告例は限られている。そこで、本研究では、チーズで提案された本評価法を、清酒の総合的なおいしさの評価、さらに食中での清酒の味わいの評価にも展開した[2)]。

一般の消費者 94 人を対象に、通常の飲食店での飲用シーンを再現するように実験系を設計し、おいしさについての官能評価を実施した。実験では、まず、食前の清酒だけの１杯目を評価し、続いて、料理とともに清酒を味わった場合の評価を実施した。評価の際の質問票は、おいしさの構成要素（報酬、食文化、情報）に基づいた質問を各 7 問、計 21 問作成し、ランダマイズして質問票に記載した。また、サンプル酒のおいしさ及び料理との相性（食中での評価時）は、Visual Analog Scales (VAS) で評価した。解析では、得られた質問への回答を因子分析し、抽出した質問より評価者ごとに算出した各要素のスコアを用いて、清酒の総合的なおいしさの VAS 値を目的変数に重回帰分析を実施した。

清酒だけで飲んだ１杯目の清酒のおいしさについて、因子分析の結果、３つの因子が抽出され、それらは報酬・情報・食文化と分類解釈された。その後の重回帰分析の結果、清酒のおいしさは、主に報酬因子の寄与が大きいことが示唆された。同時に、チーズで提案された本評価法が、清酒にも適用可能であることを示した。さらに、本シンポジウムでは、料理とともに味わった際の清酒のおいしさについて、料理との相性評価の結果や、1 杯目の清酒と同様に解析した、食中における清酒の総合的なおいしさへの各構成要素の寄与についても議論したい。

参考文献
１）K. Nakano *et al*. Food Sci. Nutr. 2013; 1:369-376.
２）R. Nakamura *et al*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2017; 81:1598-1606.

multiple regression analysis, palatability, sake

発表責任者：中村　諒（nakamuraryo@asahi-shuzo.co.jp）

講演番号：4SY08-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:55～ A01 会場

ワインと清酒の食品との組み合わせによる香味変化

Wine and sake parings with food

○藤田 晃子（酒類総研）
○Akiko FUJITA (National Research Institute of Brewing)

お酒と料理の相性が良い場合にはお酒あるいは料理だけよりも旨味などの味わいの良さが増し、悪い場合には不快な香味を感じることがある。しかし、お酒と料理の相性については経験的な知見が多く、科学的な検証例はほとんどみられない。科学的な裏付けに基づいてお酒と料理の組み合わせを提案することができれば、お酒の需要振興に役立つと期待される。そこで、酒類総合研究所は日本酒造組合中央会と共同でお酒と食品の相性について研究してきた。本シンポジウムでは、ワインと清酒に魚介類やチーズ等を組み合わせた時に生じる香味変化とその要因について、官能評価に加え、味の数値化が可能な味覚センサーを用いて検討した結果を紹介したい。

魚介類とともにお酒を飲むと、経験的に旨味が増すお酒がある一方、不快な生臭みを感じるお酒がある。そこで、魚介類のおつまみとしてポピュラーなするめとお酒の組み合わせで官能評価を行ったところ、清酒ではあまり感じられなかった生臭みや苦味・えぐ味が、白ワインでは強く感じられた。生臭みは魚介類に多く含まれるドコサヘキサエン酸（DHA）などの多価不飽和脂肪酸が劣化して生じるアルデヒド等のカルボニル化合物が原因のひとつとされているため、白ワインと清酒に DHA を添加し、生臭みはアルデヒド類の濃度を、苦味は味覚センサーの苦味強度を指標にして不快香味の変化を解析した。その結果、清酒や亜硫酸無添加ワインではほとんど変化がみられなかったが、亜硫酸を含む白ワインでは DHA の添加により不快香味が増加した。また、清酒に亜硫酸を添加し、さらに DHA を添加したところ、不快香味の増加がみられた。以上より、多価不飽和脂肪酸を豊富に含む魚介類と亜硫酸を含むお酒を組み合わせると不快香味が発生する可能性が示唆された。

次に、ワインに合うことが広く知られているチーズとお酒との組み合わせによる味の変化を調べた。味覚センサーをチーズ→お酒の順に浸して洗浄し、旨味後味を測定したところ、チーズの旨味は清酒で強く残り、白ワインで弱かった。この原因について調べたところ、ワインに多く含まれる酒石酸やリンゴ酸等の酸が旨味後味を弱くする効果があった。このことから、酒石酸やリンゴ酸を多く含むワインではチーズのようにグルタミン酸ナトリウムやペプチドが旨味やこく味の主体となっている食品の味を舌から洗い流しやすく、酸をワインほど多く含まない清酒では舌に残りやすい可能性が示唆された。以上の結果は、チーズにはワインと清酒ともに相性が良いとされるが、ワインではチーズの味が控えめに感じられるのに対し、清酒ではチーズそのものの味がよくわかるという実際の味覚を裏付けるものと考えられた。

wine, sake, food

講演番号：4SY08-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:20～ A01 会場

コーヒーの美味しさについて

Science behind tasty coffee

○旦部 幸博（滋賀医大医）
○Yukihiro Tambe (Shiga Univ. Med. Sci.)

コーヒーは現在、一日当たり約 25 億杯が消費される世界的飲料である。一般に、自然界において生物が忌避すると言われる「苦味」がその味の中心であるにも関わらず、世界中でこれほど多くの人に嗜好されている点は、飲食物の中でも独特な存在だと言える。

日本で用いられる、コーヒーの香味を表現するための「味ことば」の調査結果によれば、「香ばしい」「まろやか」「コク」など、一般消費者が美味しさを連想しやすい語彙が多く上げられており、現代の日本人の多くがコーヒーを「美味しいもの」と認識していることを示唆している。

ただし、世界や日本でその飲用が始まった最初期の文献では、「苦い」「焦げ臭い」など、その香味を美味しいと評価している記述はほとんど見られない。コーヒー飲用の起源には不明な点も多いが、15 世紀頃のイエメンのイスラーム神秘主義者（スーフィー）たちが、徹夜で勤行するときの目覚ましに利用したのが普及のはじまりであった。ヨーロッパに伝播した際も当初は健康に良い飲み物として紹介され、その後、コーヒーハウスやカフェの流行と同時に飲用習慣が定着し、次第に美味しい飲み物として受容する人々が現れた。すなわち、人々が最初からコーヒーに美味しさを感じていたというよりも、まずは薬理作用や文化的な流行から社会に普及し、それによって「美味しい」という評価が成立してきた例だと捉えられる。この社会的認容を背景に、多くの人々はそれぞれ幼少期にはあまり好まなかったコーヒーの苦味を、飲んでいくうちに受け入れるようになり、最終的にはブラックコーヒーの苦味にも「美味しさ」を見いだすようになると考えられる。

コーヒーの香味を特徴づける成分の解明も、近年の研究によって進展してきた。コーヒーの苦味成分としては、従前はカフェインが重要だと言われてきたが、近年ではむしろ焙煎過程で生成するクロロゲン酸ラクトン（CQLs）やビニルカテコールオリゴマー(VCOs)が主要な苦味物質だと考えられている。コーヒーにはこの他にも多種類の苦味物質が含まれており、この「苦味の多様性」がコクや美味しさの感覚にも関連すると考えられる。香りの解明も進んでおり、これまでに総計約 1000 種類の揮発性成分が報告されるとともに、焙煎過程で生み出される 2-フルフリルチオールやアルキルピラジン類、フラノン類など、重要度の高い数十種類の香気成分が特定されている。

また近年、アメリカを中心にしたスペシャルティ（高品質）コーヒーの流行を背景に、新品種の育種や、生豆精製時の発酵コントロールを通じて、個性的で優れた香味を生みだす科学的手法への関心も高まっている。これらの新潮流についても紹介する。

coffee, flavour, molecular gastronomy

発表責任者：旦部幸博（tambe@belle.shiga-med.ac.jp）

講演番号：4SY08-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ A01 会場

和食のだしの美味しさの鍵となる香気成分
Key aroma components contributing for palatability of Japanese *dashi*
○網塚 貴彦（長谷川香料（株）総合研究所）
○Takahiko Amitsuka (T.HASEGAWA CO.,LTD)

だしは日本料理のベースとして欠かせないものであり、だしが効いていない料理は物足りなく感じる。様々な食材からだしが得られるが、中でもかつお節と昆布は基本となる食材である。だしはユニークな味と香りを有しているが、特に香気に注目しどのような成分が嗜好性に寄与するのか検討した。
また、昆布についても老舗の京料理人の協力を得て昆布だしの香気成分分析を行い、新規の重要香気成分を見出した。これらの知見について紹介する。

<u>かつお節について</u>
動物実験を用いて強化効果と嗜好性に寄与する香気成分探索を行った。結果、かつお荒節から超臨界二酸化炭素抽出法にて得られた抽出物に、強化効果と高い嗜好性が確認された。
この抽出物を GC-MS 分析および匂い嗅ぎによる香気貢献度の高い成分の絞り込みを行うことで、香気貢献度の高い 9 成分と 1 つの未知化合物が検出された。
その未知成分を推定し合成した結果、(4*Z*, 7*Z*)-trideca-4,7-dienal(TDD)であると同定し、食品から初めて見出した成分であった。官能評価を実施し、TDD がかつお風味に寄与することが示された。
また NIRS(Near-infrared spectroscopy)を用いた生理応答計測結果から、TDD が「より食べたいという美味しさ（摂食モチベーション)」に寄与することを見出した。

<u>昆布だしについて</u>
京料理で特に好まれる熟成した天然利尻昆布から京都の天然水を用いて出汁を引き、香気に寄与する成分探索を行った。フレーバーリストと京料理人が GC-MS 匂い嗅ぎを実施することで、追跡すべき重要香気成分の探索を行い、未知の重要香気成分が絞り込まれた。
推定および合成を行った結果、3,4-dimethyl-5-propylidenefuran-2(5*H*)-one であることが同定され、天然物中から初めて見出された成分であった。
官能評価の結果、「後引き・余韻」や「昆布だしらしさ」を増強する成分であることを見出した。

このようにどのような香気成分が寄与しているのか把握することで、より一層の「美味しさ」を目指した飲食品が広まり、生活が豊かになる一助になることを目指している。

dashi, key aroma component, palatability

発表責任者：網塚　貴彦（takahiko_amitsuka@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：4SY08-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:10～ A01 会場

「和食」の美味しさについて

Core of Washoku

○高橋 拓児（木乃婦）
○TAKUJI TAKAHASHI (KINOBU)

ここ近年、日本料理の調理技術の発展は目覚ましいものである。今まで行なってきた調理が科学的に明らかにされ、調理に関する温度・湿度・時間が以前よりも重要視されることとなった。魚や卵等のタンパク質凝固、糖類のメイラード反応、低温貯蔵庫での熟成など、非常に緻密な条件下のもと調理が行われ、新しい料理が構築されている。

今はそれが当たり前となり、日本料理は次のステージへと進もうとしている。日本料理の料理人が今までと異なる思考を駆使し、異なるプロセスを経て、新しい料理を生み出している。それは、エルブジのような最先端の調理器具を使うわけでも無く、研究者から提供された新しい研究成果の応用でも無く、料理人が最先端の科学的思考を持たなければ考えつかない手法で料理を完成していくのである。

例えば、「牛テールの赤ワイン煮込」という料理は、フランスのブルゴーニュ地方の郷土料理である。この料理はブレゼという調理法で多少の灰汁以外は、全て一緒に煮込んでしまうため非常に脂っこい料理となる。これを日本料理として出すには非常に無理があるのは、無論疑いの余地はない。しかし、科学的なアプローチを踏んで正確に和食のコンテクストを作成していけば和食におさめることが可能となったのである。全く日本料理の国境線を超えている料理を日本料理の枠内に収める能力が身に付きつつある。過去の日本料理の食材と調理法の洗い出し、それと同時にフランス料理の成分分析、抽出、再構成を進め、日本料理に必要な文脈を形作っていくのである。

これは一例ではあるが、こういった料理人による食へのあくなき追求によって、新たな美味しさが発見されることは、いつの時代も一般の食生活をより良いものとしてきた。こうして新しい食の融和によって和食が進化するとともに、和食の本来の美味しさが際立って見えてくるのである。

講演番号：4SY09-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:15～ A02 会場

生体イメージングによる食シグナルの可視化解析

Visualization of food signals in living mice

○安達 貴弘（東京医科歯科大学）
○Takahiro Adachi (Tokyo Medical and Dental Univ.)

カルシウムイオンはほとんどすべての細胞でセカンドメッセンジャーとして使われ、非常に鋭敏かつ幅広いシグナル伝達系で利用されている。そこで生体イメージングに適したカルシウムバイオセンサーYellow Cameleon 3.60（YC3.60）を用いCre/LoxPによる細胞系譜特異的YC3.60発現マウスを作製した。各種Cre発現マウスと交配した細胞系譜特異的YC3.60発現マウスを用い、脾臓、骨髄、パイエル板などの生きたままのマウス個体での生体イメージングにより、免疫細胞の動態のみならず、カルシウムシグナルも検出できる５D生体イメージング（x、y、z、時間、カルシウムシグナル）を確立した。

この系を利用し、自己免疫疾患やアレルギーモデルマウスにおいて、リスク因子を持つが病態を発症しないモデル系（超早期未病）の解析と、実際に病態を発症するモデル系の解析結果から、病態を発症前からリンパ球のカルシウムシグナリングに異常があることを見出しており、リスク因子の存在による微細な異常が検出できることを示した。このことは病態発症より前の超早期の異常（未病）検出を可能にするものである。

また、細胞系譜特異的 YC3.60 発現マウスを用いた生体イメージングを発展させ、これまでブラックボックスであった食品成分による腸管でのシグナル応答のリアルタイムでの可視化システムも開発してきた。腸管では、免疫細胞および末梢神経細胞の半数以上が集中しており、神経－免疫－腸管上皮のクロストークにより、これら食シグナルの生理的な機能が決定されていると考えられる。そこで、神経特異的あるいは腸管上皮特異的な YC3.60 発現マウスを作製し、腸管神経叢あるいは腸管上皮細胞でのカルシウムシグナリングの検出系も構築した。また、乳酸菌・納豆菌などにそれぞれ食品成分に応答し、カルシウムシグナリングを惹起していることを見出し、食シグナルがリアルタイムで可視化できることを示してきた。現在、これらを組合せて、腸管での上皮―神経―免疫のクロストークの全容解明、食シグナルの腸管での評価システムの確立とともに、早期の未病検出系を利用して食による未病の予防、治療法の確立を目指して研究を行っている。

imaging, food signal, calcium signaling

発表責任者：安達貴弘（tadachi.imm@mri.tmd.ac.jp）

講演番号：4SY09-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:45～ A02 会場

脂肪酸受容体と栄養－神経－エネルギー代謝制御

Energy metabolic regulation via free fatty acid receptors

○木村 郁夫（東京農工大農）
○Ikuo Kimura (Tokyo Agri Tech Univ.)

古くから“医食同源”の概念として知られる様に、食生活は生体内の恒常性を調節し、その調節機構の破綻は生活習慣病に繋がる。近年の食品科学の進歩に伴い、食と健康の関係が単なる現象論だけではなく、その分子作用機序の解明という科学的根拠に基づいた証明が為され始めた。特に、細胞膜上脂肪酸受容体群の同定により、食由来脂肪酸が単なるエネルギー源であるだけではなく、シグナル分子として重要であることが明らかとなり、肥満・糖尿病等の代謝疾患の創薬標的分子として、これら脂肪酸受容体群は注目されている。また、腸内細菌叢がその宿主のエネルギー調節や栄養の摂取、免疫機能等に関与し、その結果、肥満や糖尿病などの病態に直接的に影響するという多数の報告から、医学的側面からも食と腸内細菌、健康への関心は益々高まり、その結果、腸内細菌と宿主恒常性維持の分子機序の解明が早急の課題となった。この中で、我々は独自にこれら脂肪酸受容体と腸内細菌叢の関連に着目した。食由来の、特に食物繊維由来、腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸や、食用油、リノール酸、αリノレン酸に代表されるω6−、ω3−脂肪酸の腸内代謝脂肪酸による生理機能への影響について、この脂肪酸受容体を介した神経系からのエネルギー代謝制御について概説する。

GPCR, Nutrition, Fatty Acids

発表責任者：木村 郁夫（ikimura@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4SY09-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:15～ A02 会場

ラット母子分離ストレスモデルにおけるストレス関連行動と腸内細菌の相関

Correlation between stress related behaviors and microbiota in rat maternal separation model

○内藤 裕二、村上 貴彬、鎌田 和浩 (京都府立医科大学消化器内科)
○Yuji Naito, Takaaki Murakami, Kazuhiro Kamata (Kyoto Prefectural University of Medicine)

【目的】幼少期ラットに母子分離(MS)を行うと成育時にストレスに対する過剰な反応を示すため，過敏性腸症候群(IBS)のモデルとして現在用いられている．われわれは，MSモデルではストレス関連ペプチドであるCRHの反応性が亢進することを報告してきた,今回ラットMSストレスモデルを使用し体重変化，および行動試験の結果と腸内細菌叢の変化との相関を検討し，カロテノイドの一つであるアスタキサンチン摂餌の影響を評価した.
【方法】Wistar系雄性ラットを使用し，生後2-14日目まで1日3時間のMSを行った．その後，MS施行群（MS群），対照群（C群）ともに8週齢までは同様に飼育した．アスタキサンチンは0.02%の濃度で混餌投与した（A群）。8週齢の時点でCRH(10μg)もしくは生理食塩水の経静脈投与を行い， CRH投与後2時間の便排出個数を計測，腸管の病理組織所見，盲腸内容物の腸内細菌叢，腸管局所の各種神経ペプチドの発現を比較した．また行動試験でストレス評価を4-5週齢に行った．また離乳直後(3週齢)，5週齢，9-10週齢の時点で体重測定を行い,その後犠死させ，盲腸内容物に対する16S rRNA v3-v4領域メタゲノム解析を行った．増減が目立った細菌と体重や行動試験との相関を検討した.
【結果】便排出個数は，C群においてCRH投与と生理食塩水投与では有意差は見られなかったが，MS群においてはCRH投与により生理食塩水投与と比べ有意に増加した．またいずれの群においても結腸の組織所見や局所の神経ペプチドおよびその受容体の発現に変化は見られなかった.A群では,MS群で増加した排便個数は有意に低下した．離乳直後の体重はMS群が有意に重いものの,9-10週齢では差は見られなかった．病理組織ではいずれの群も炎症所見を認めなかった．16S rRNAメタゲノム解析の主成分分析によりMS群とC群は区別され，MS群ではVerrucomicrobiaの割合の増加，Clostridiaの割合の減少を認めた．Verrucomicrobia，Clostridiaは9-10週齢の体重に強い負または正の相関を示し(Spearman r: -0.479, 0.375)，行動試験においてVerrucomicrobia とhead dip回数，rearingはそれぞれ強い正または負の相関を示した(Spearman r: 0.463, -0.344)．一方でClostridiaはVerrucomicrobiaにくらべ行動試験と強い相関を認めなかった.
【結論】MS後の腸管運動亢進にアスタキサンチンは有効であった．MS負荷により離乳直後までの体重は増加した．また成育時までに形成される腸内細菌の変化がストレス形成の要因である可能性が考えられた．事業名：「SIP(次世代農林水産業創造技術)委託研究」(農研機構)

microbiota, maternal separation, irritable bowel syndrome

発表責任者：内藤裕二（ynaito@koto.kpu-m.ac.jp）

講演番号：4SY09-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ A02 会場

玄米機能成分を活かした脳機能改善と生活習慣病予防のアプローチ

Brown rice-specific γ-oryzanol-based novel approach toward lifestyle-related dysfunction of brain

○益崎 裕章、小塚 智沙代、與那嶺 正人、岡本 士毅（琉球大学）
○Hiroaki MASUZAKI, Chisayo KOZUKA, Masato YONAMINE, Shiki OKAMOTO (Ryukyu Univ.)

天然の完全食とも呼ばれる玄米にはビタミンやミネラル、食物繊維、機能成分が豊富に含まれており、食後の血糖スパイクを抑制する低 GI 食品として、腸内フローラのバランス異常を改善するプレバイオティクスとしての効用が注目されている。動物性脂肪に対する依存は生活習慣病の基盤病態として重要であるが臨床医学の現場では未だ解決の手立てを欠いている。そこで私達は動物性脂肪の習慣的摂取が惹起する脳内報酬系のドパミン受容体（D2R）シグナル低下の分子メカニズムとして、動物性脂肪の過剰に伴う D2R 遺伝子プロモーター領域（CpG アイランド）の DNA メチル化亢進に伴うエピゲノムの関与に注目した。まず、マウス実験から動物性脂肪は脳内において部位特異性を持って炎症・小胞体ストレス・ゲノム修飾を惹起し、視床下部では炎症や小胞体ストレスを、報酬系ではエピゲノム変化を誘導し、両面から動物性脂肪に対する依存性を形成することを明らかにした。そして、玄米機能成分であるγオリザノールが脳内報酬系に作用し、DNA メチル基転移酵素活性を抑制するエピゲノム・コントローラーとして機能し“満足できない脳”を“足るを知る脳”に変える新規の分子メカニズムが明らかとなった（**Diabetologia 60:1502-1511, 2017**）。経口摂取したγオリザノールは視床下部において炎症や小胞体ストレスを緩和し（**Diabetes 61:3084-3093, 2012**）、報酬系においてエピゲノム変化を正常化させるというユニークなメカニズムが解明出来たことにより、今後、玄米機能成分を活用する脳機能改善や生活習慣改善を指向する食品や医薬の開発が加速することが期待される（**Drug Delivery 24:558-568, 2017, Endocrinology 156:1242-1250, 2015, British J Pharmacol 172:4519-4534, 2015**）。既に実用化に成功しているγオリザノール高含有発酵飲料（玄米オリザーノ）による介入臨床試験の結果も一連の動物実験の成績をよく反映しており、飲用前の腸内フローラバランスの乱れ（ファーミキューテス門/バクテロイデテス門の比率の高い群）や食習慣の乱れ（ジャンクフード・ファストフード習慣を持ち、野菜摂取の少ない群）が大きい被験者ほど、この発酵飲料が効果的であることが明らかとなった（農水省フードアクションニッポンアワード **2015** 研究開発・新技術部門 優秀賞）。本講演では認知機能障害や依存症など、超高齢社会における深刻な医療問題に対する玄米機能成分の有用性について、私達の研究成果を踏まえて御紹介したいと思う。

Brain reward system, γ-oryzanol, Brown rice

発表責任者：益崎裕章（hiroaki@med.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：4SY09-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:15～ A02 会場

難吸収性ポリフェノールの消化管センシングを介した作用メカニズムの解明

Elucidation of physiological alteration following adnministration of pooly absorbable polyphenols via GI sensing

○越阪部 奈緒美（芝浦工大　生命）
○Naomi Osakabe (Shibaura Institute of Tech.)

ポリフェノールの摂取が心血管系疾患のリスクが低下させることは、これまでの多くの疫学・介入試験およびその後のメタアナリシスから明らかとなってきた。しかしながら、ポリフェノールは消化管から吸収されにくいこと、また吸収されたとしても水溶性の極めて高い代謝物として血中に存在することから、その作用メカニズムは未だ明らかとなっていない。我々は難吸収性ポリフェノールのモデル化合物として(-)-epicatechin およびその重合物である procyanidin を含む flavan 3-ols 画分を用いて、動物に単回経口投与した後の生理的変化に着目しメカニズムの解明を進めてきた。その結果、食品から摂取可能な量の flavan 3-ols は、投与直後から血圧・心拍数を一過的に上昇させること、また熱産生を高めることを見出した。更にこれらの変動はアドレナリン受容体ブロッカーの併用により消去されることを確認した。以上の結果は、flavan 3-ols の摂食刺激が交感神経活動を亢進させることを示している。一方、知覚神経除去モデルラットを用いて同様の検討を実施したところ、循環および代謝系に対する flavan 3-ols の変動は消失したため、flavan 3-ols は消化管知覚神経に認識された結果、このような生理学的変動を発現することが示唆された。そこで、知覚神経除去モデルラットの脊髄後根神経節のトランスクリプトーム解析を実施したところ、幾つかの膜貫通型タンパク質をコードする遺伝子の発現が顕著に低下した。現在 flavan 3-ols の標的分子を特定するべく、これらのタンパク質について解析を進めている。

一方、生体はストレスに応答して、視床下部–交感神経–副腎髄質系（SAM 軸）を介して交感神経活動を亢進するとともに、視床下部–下垂体前葉–副腎皮質系（HPA 軸）を活性化することが知られている。Flavan 3-ols が誘導する循環及び代謝系の変動は SAM 軸の活性化によると考えられる。そこで flavan 3-ols の HPA 軸に対する影響について検討したところ、flavan 3-ols 投与後に視床下部室傍核における神経活動マーカーである cfos および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）の mRNA 発現の顕著な増加が認められ、血中コルチコステロンの有意な上昇が見られた。以上の結果から、flavan 3-ols の摂食刺激は生体にストレッサーとして認識されることが明らかとなった。

近年、運動が恒常性の維持・増進に極めて有効であることが明らかとなった。運動は生体にストレスとして認識され、循環・代謝だけでなく認知機能にも有益であることが確認されている。ポリフェノールの摂食刺激も同様にストレスとして生体に認識されることから、心血管系疾患のリスク低下だけでなく広く恒常性の維持・増進に寄与することが予測される。

polyphenol, sensing, GI tract

発表責任者：越阪部奈緒美（nao-osa@sic.shibaura-it.ac.jp）

講演番号：4SY10-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A03 会場

はじめに～鳥類卵膜の構造と生理機能の分子基盤

Introduction - Molecular bases of avian egg-coat structure and physiological functions.

○奥村 裕紀 (名城大農)
○Hiroki Okumura (Meijo Univ.)

人類は古来より、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、アヒルなどの鳥類を家禽として飼育し、肉や卵などを利用してきた。そして、それらの生産性の向上に寄与することを主な目的として、家禽の育種をはじめ、卵形成機構、生殖機構、胚発生、内分泌系などに関する多方面からの研究が行われてきた。特に、20 世紀中盤以降の生化学的・分子生物学的な研究手法の発展により、鳥類に特有の生理現象やそれらを司る様々な調節機構の存在が明らかとなり、分子メカニズムの解明を目指した研究が現在も続けられている。本シンポジウム (4SY10) では、主に生殖機構に関わる鳥類に特有の制御機構の解明を目指した基礎的な研究、および、鶏卵の機能性成分や有用物質生産への利用を目指した応用的な研究について、最新の成果を紹介し、鳥類の生理現象とその利用に関する研究が私たちの生活の質の向上にいかに寄与できるか、農芸化学の視点から考える。

受精における卵–精子間相互作用は、様々な分子が協調的に関与する複雑な現象である。その分子メカニズムの全容が明らかとなれば、家畜や希少動物の繁殖技術、さらには生殖医療の発展にとって有用な知見がもたらされると考えられる。脊椎動物の卵細胞は、ZP ファミリーに属する糖タンパク質群 (ZP タンパク質) が会合した繊維からなる特殊な細胞外マトリックス、卵膜 (哺乳類の透明帯に相当) に覆われている。よって、自然条件下の受精では、卵膜を通過した精子のみが卵と融合する。卵膜は精子と動物種選択的に相互作用して精子を活性化する機能をもち、哺乳類などでは多精子受精の防止にも関与する。また、卵膜に対する自己免疫反応や卵膜の形成異常は、不妊と関連することが知られている。これらのことから、卵膜は受精の正常な進行にとって重要な役割をもつと考えられる。

哺乳類と異なる生殖機構を進化させた鳥類の卵膜は、哺乳類の透明帯にはみられない多くの特徴をもつ。例えば、鳥類の排卵直前の卵膜は ZP1、ZP3、ZPD の 3 種の ZP タンパク質を主成分とし、ZP1 だけが卵巣ではなく肝臓で合成され、血液中を卵巣まで運搬される。ZPD は哺乳類の尿中に分泌されるウロモジュリンの鳥類ホモログであり、哺乳類の透明帯には存在しない。また、ZP3 は精子結合能を示すが、精子活性化能を示すのは主に ZP1 と ZPD である。私たちは、鳥類の卵膜と哺乳類の透明帯に対するそれぞれの研究成果を比較することにより、脊椎動物に普遍的な受精の制御機構を解明することができると考えている。本演題では、ニワトリ卵膜に対するこれまでの研究によって解明・推定された、ZP タンパク質の構造、分泌機構や卵膜の分子構造モデルなどを概説するとともに、ZP タンパク質の複雑なプロセシング機構や未知機能の存在を示唆する最新の研究成果を紹介する。

zona pellucida, egg coat, ZP proteins

発表責任者：奥村裕紀（hokumura@meijo-u.ac.jp）

講演番号：4SY10-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A03 会場

鳥類の輸卵管における精子貯蔵機構とその応用

Oviductal sperm storage in birds

○笹浪 知宏（静岡大農）
○Tomohiro Sasanami (Shizuoka Univ.)

動物は受精戦略に工夫を凝らし、生存競争を勝ち抜く事で今日における進化を遂げてきた。鳥類は季節繁殖を行う動物であり、その受精戦略は非常に巧みである。繁殖期には短期間に複数の卵子を排卵し産卵するが、それらの卵子すべてを効率良く受精させるために、精子を貯蔵する特殊な組織を輸卵管に持っている点はその一例である。精子貯蔵管（Sperm storage tubules: SST)と呼ばれるこの組織中で、精子は長期間受精能を維持するので、一度の交尾で長期間受精卵を産み続けることが可能である。このような輸卵管における貯精現象は、受精を効率良く行うための一種の補償機構と考えられている。

鳥類の輸卵管における貯精の仕組みは不明であったが、これまでの研究で、性ステロイドであるプロゲステロンが SST からの精子の放出のトリガーとなっていることが明らかになり、血中プロゲステロン濃度の上昇が精子放出と排卵とを同調させることが分かった(Ito *et al., Endocrinology*, 2011)。また、精子の放出のタイミングに同調して、輸卵管内腔表面を覆っている上皮細胞からは分子シャペロンである heat shock protein 70 が放出され、これが精子表面の電位依存性アニオンチャネルに結合すると細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり、この反応を介して精子の運動が活性化されることも分かった（Hiyama *et al., Reproduction,* 2013)。また、SST 内の精子は貯精時に運動を停止している。SST は細胞外に多量の乳酸を放出し、SST 内腔を酸性化していることが判明した。SST 内腔に侵入し乳酸に暴露された精子は細胞内 pH を低下させ、その結果、Dynein ATPase 活性が低下することで精子の運動が停止することが判明した。以上のように、鳥類では、一旦精子を SST 内に貯蔵するという戦略により、精子と卵子との出会いのタイミングを雌側が調節するとともに、卵形成時に卵管から大量に分泌される卵白や卵殻に精子がトラップされるのを防ぐという受精補償機構が機能していることが明らかとなった。

これらの驚異的な仕組みを応用すれば、これまで困難であった、精子の長期間の液状保存が可能となり、家畜や家禽の人工繁殖後術の発展に寄与するものと考えられる。

Fertilization, Sperm Storage Tubules, Domestic birds

発表責任者：笹浪知宏（atsasan@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4SY10-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A03 会場

生殖細胞の凍結・移植による家禽遺伝資源の長期保存

Preservation of poultry genetic resources through freezing and tansplantation of germ cells.

○中村 隼明 (広島大生物圏科学)
○Yoshiaki Nakamura (Hiroshima Univ.)

動物遺伝資源の保存は、遺伝的多様性の保全と、長い年月をかけて改良してきた産業有用品種のバックアップという 2 つの観点から極めて重要である。主要な家畜、マウスやヒトでは、卵子や胚、精液を凍結保存し、胚移植や人工授精によって個体を復元する技術が実用化されている。一方、ニワトリやウズラ、カモといった家禽では、ほ乳類で確立された卵子や精液の凍結保存が技術的に困難であり、遺伝資源の長期保存技術の開発は早急に対応すべき課題であった。

始原生殖細胞 (PGC) は、発生初期に出現する配偶子の起源細胞である。鳥類では、胚体外で出現した PGC が血流中を一過的に循環して生殖巣へ移動する。先行研究において、PGC を採取し、別の宿主胚の血管内へ移植して、卵や精子を産生する技法がニワトリで構築された。しかし、PGC の操作の根幹となる採取・凍結保存・移植の各ステップの効率が非常に低く、これが実用化の障害になっていた。そこで演者らは、ニワトリをモデルに用いて、1) PGC の採取と移植の最的期の探索、2) PGC の凍結保存法の改善、3) 胚を最大限有効活用した PGC 採取法の開発と希少品種保存の実践、4) 内在性 PGC 除去胚を利用した超効率的な個体復元技術の開発、によって PGC を用いたニワトリ遺伝資源保存の技術体系を纏め上げた。また、一連の技術をウズラに応用することにより、他種への発展性を証明した。これらの研究成果に立脚して、天然記念物 8 品種を含むニワトリ 15 品種とウズラ 3 系統の PGC を凍結保存してきた。現在、最近ニワトリで可能になった PGC の長期培養法を応用し、産卵数が非常に少ない希少・絶滅危惧品種の個体増殖に取り組んでいる。

germ cell, cryopreservation, transplantation

発表責任者：中村隼明（ynsu@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4SY10-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A03 会場

比較生物学と異分野融合研究による季節適応機構の理解とその制御

Understanding the mechanism of seasonal adaptation and its application by comparative and interdisciplinary approach

○吉村 崇[1,2,3] ([1]名大 ITｂM、[2]名大院生命農学、[3]基生研)
○Takashi Yoshimura[1,2,3] ([1]ITbM, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]NIBB)

日本人は四季の移ろいを愛でる国民であり、サクラの開花やウグイスのさえずりを通じて春の到来を実感する。動物の行動の季節変化についてはアリストテレスの著書「動物誌」にも詳しく記述されているが、動物が季節を感知し、四季の環境変化に適応している仕組みは謎に包まれていた。

生命を理解しようとするとき、様々な生物から最適なモデルを選ぶことが近道である。例えばマウス、ラットは季節の変化に明瞭な反応を示さないため、季節を感じる仕組みの研究には適当ではないと信じられてきた。一方、鳥類は空を飛ぶため、生殖器を必要な時期だけ発達させる。特に雄では日長（光周期）が長くなると精巣がたった 2 週間で約 100 倍に発達する。日長の変化にこれほど急速かつ劇的に反応する生物は珍しく、鳥類、とりわけウズラは季節適応の解明に最適なモデル生物といえる。そこで我々はウズラが日長の変化に反応して繁殖を開始する季節繁殖の仕組みを解明することにした。

1960 年代の研究からウズラの季節繁殖を制御する中枢は視床下部に存在すると考えられていた。そこで我々はウズラの視床下部で、長日刺激によって誘導を受ける遺伝子を探索し、*DIO2* 遺伝子を単離した。*DIO2* 遺伝子は甲状腺ホルモンの T_4 を T_3 に変換する甲状腺ホルモン活性化酵素(2 型脱ヨウ素酵素)をコードしていたことから、日が長くなると視床下部で局所的に T_3 が合成されることが、季節繁殖の開始に重要であることが明らかになった。さらにその後、機能ゲノミクスにより、*DIO2* 遺伝子を制御する遺伝子カスケードを明らかにした。すなわち、長日刺激によって下垂体の付け根に位置する下垂体隆起葉で TSH が産生されると、視床下部に作用し *DIO2* 遺伝子の発現を制御することで脳に春を伝えることが明らかになった。また、TSH 受容体欠損マウスを用いて、ウズラで明らかにした仕組みが哺乳類においても保存されていることを明らかにした。さらに TSH の組織特異的な糖鎖修飾が、隆起葉由来の TSH と前葉由来の TSH の情報の混線の防止に寄与していることを明らかにした。

動物の日長測定には約 24 時間のリズムを刻む概日時計が関与している。したがって概日時計を調節する薬ができれば、動物の繁殖の向上に貢献することが期待される。また、概日リズムの不調がヒトの精神疾患や代謝異常などにつながることも知られている。我々は現在、概日リズムを調節する化合物のスクリーニングを通じて、動物の繁殖とヒトの健康を向上する化合物を探索している。本講演では我々の研究を紹介しながら、比較生物学と異分野融合研究の可能性について考察したい。

Japanese quail, circadian clock, chemical screening

発表責任者：吉村崇（takashiy@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY10-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A03 会場

鳥類における遺伝子操作

Avian genetic engineering: DNA technology applications

○水島 秀成（北大理）
○Shusei Mizushima (Hokkaido Univ.)

近年、TALEN（transcription activator-like effector nuclease）や CRISPR/Cas（clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins）システムをアレンジした人工制限酵素の登場により動物ゲノム改変技術の加速化が進んでいる。哺乳類においても、人工制限酵素の RNA を 1 細胞期受精卵に注入することで、ダイレクトに遺伝子変異したマウス個体を得る手法も確立され、本手法は従来の胚性幹細胞の培養を介したゲノム改変に代わる技術として注目されている。一方鳥類では、2006 年に長期間 *in vitro* で多分化能を保持する始原生殖細胞（primordial germ cell：PGC）の培養技術が確立され、2012 年以降に piggyBack システムによる遺伝子導入 PGC が作出された。また 2014 年に TALEN、2016 年に CRISPR/Cas システムを利用したゲノム編集 PGC も作出され、鳥類においてもゲノム編集が可能であることが初めて証明された。しかし、PGC の株化に種の特異性や性染色体型（雌型（ZW）PGC の培養が困難）に制限がある問題や、生殖系列キメラの作出を介した培養 PGC からの個体復元では、ホモノックアウト雌個体の作出に 2 年近くの歳月を要するなど、実用面に向けた課題が現在もなお残されている。

我々は、PGC の培養にかわるゲノム改変家禽の作出手段として、顕微授精法（intracytoplasmic sperm injection: ICSI）の応用が理想的であると考えている。鳥類卵の細胞質は不透明であることから、哺乳類の前核注入に相当する技術を利用することは極めて難しい。しかし、ICSI 法は精子ベクター法を利用することで外来核酸を前核に持ち込む事ができる為、1 細胞期卵での遺伝子変異が十分に可能であると考えられる。そこで、我々はこれまでに受精時に 1 個の卵内に複数の精子が連続的に侵入する鳥類多精受精機構の生理的意義を追求し、複数個の精子分量に相当する精子可溶性タンパク質をウズラ卵に投与することで、多精受精に関連する細胞内シグナリングを体外で再現することに成功した。さらに精子可溶性タンパク質から、ホスフォリパーゼ C ゼータ、クエン酸合成酵素およびアコニット酸ヒドラターゼを受精ファクターとして単離するとともに、2014 年には 1 個の精子と受精ファクターを利用・応用することで、ICSI ウズラ雛の孵化育成に初めて成功した。その後、この確立した ICSI 法を用いて、精子ベクター法によるランダムインテグレーション遺伝子導入技術も可能にした。本講演では、以上の点を踏まえて、農畜産および医薬産業応用に向けた鳥類ゲノム改変技術の応用について考察したい。また CRISPR/Cas システムを用いた鳥類ゲノム編集の有用性についても概説したい。

intracytoplasmic sperm injection method, avian polyspermic fertilization, genome modified bird

発表責任者：水島秀成（smizus@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY10-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ A03 会場

個別化食としての「デザイナーエッグ」
"Designer eggs" for individualized diet

○石川 伸一（宮城大食産）
○Shin-ichi ISHIKAWA (Miyagi Univ.)

本研究室では、今後重要になると予想される個人個人に合わせたテーラーメイド食品（個別化食品）として、栄養成分を強化した卵または疾病を予防する卵黄抗体などに関連した「デザイナーエッグ」の開発に取り組んできた。通常、卵中の各種成分含量は比較的一定の範囲内にあるが、ニワトリの飼料中のビタミン、ミネラルなどの含量を変えることで、卵中にそれらの栄養素が多く含まれる「栄養強化卵」が多数開発されている。また、もともと卵に含まれていない共役リノール酸などの健康機能を有する成分を飼料中に添加し、鶏卵中に高濃度に蓄積する卵の開発も行われている。

現在、ビタミン D、E、DHA など二種類以上の栄養素を増強したマルチな栄養強化卵も市販されている。マルチな栄養素の強化卵の研究が進めば、特定の人をターゲットしたオーダーメイドの機能性卵の開発も可能である。例えば、妊娠中に摂取要求量が高くなる栄養素（ビタミン D や葉酸など）を強化した「妊婦用卵」、高脂血しょうの患者のために n-3 系不飽和脂肪酸と共役リノール酸を強化した「脂質代謝改善卵」、抗酸化作用を有するセレンやビタミン A、E、ルテインなど強化した「老化防止卵」など，新しい製品の可能性は無限に考えられる。

ビタミン、ミネラルを濃縮した栄養強化卵は、単なる「大きな錠剤」とも考えられるが、サプリメントと大きく異なるところは、栄養強化卵が生鮮食料品であるため、さまざまな食品に加工・利用でき，食品として摂取できることである。また、機能性成分を栄養強化卵から摂取した方が、サプリメントで摂取するよりも吸収性が高いこと（葉酸、ルテイン）や、有効成分が卵に移行する過程でより活性型に変わる（大豆イソフラボン、フコキサンチン）などの機能性卵独自の優位性が示されれば、今後これらの機能性卵の市場価値はますます高まって行くものと思われる。

また、ニワトリが産む次世代の生命カプセルである卵には、母親からの移行抗体である免疫グロブリンが含まれており、生体防御系が未熟なヒナの感染防御に役立っている。卵黄中の移行抗体は、「卵黄抗体」とよばれており、特定の抗原でニワトリに免疫すると、卵黄中からその抗原に対して特異的抗体を得ることができる。この卵黄抗体は、実際、ヒトや動物が経口的に摂取することで、口腔内や消化管内での病原菌の付着感染を阻害する予防および治療薬としても研究・開発されている。

もともと完全栄養食ともいえる卵に、各種の栄養素を増強し、新たな保健的機能を追加して個人個人にマッチさせた「超卵（スーパーエッグ）」ともいえるデザイナーエッグは、国民の生活の質の向上、QOL に大きく寄与するものとして今後ますますその開発が期待される。

designer egg, individualized diet, tailor-made foods

発表責任者：石川　伸一（ishikawa@myu.ac.jp）

講演番号：4SY11-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A04 会場

皮膚形成と血液凝固を担うタンパク質架橋酵素のメダカを用いた解析

Characterization of transglutaminases in medaka

○人見 清隆（名大院創薬科学）
○Kiyotaka Hitomi (Nagoya Univ., Grad. Sch. Pharm. Sci.)

タンパク質架橋酵素（トランスグルタミナーゼ：以下 TGase と略記）は、特定のタンパク質基質のグルタミン残基とリジン残基の間に、共有結合レベルで架橋形成を触媒する酵素であり、微生物、植物、動物に幅広く存在する。本酵素により基質となるタンパク質の構造や機能は大きく変換されるため、この反応は様々な生命現象に関わっている。ヒトを含めて哺乳類では酵素ファミリーとして 8 種類のアイソザイムが異なる組織分布で発現している。明確な役割としては血液凝固や、皮膚表皮の硬度化、転写制御などがあるがその生理学的な役割は未知な点も多い。また異常な活性発現は様々な疾患をもたらすため、そのための薬剤開発も進められている。

メダカなどの魚類にも TGase による架橋反応は存在すると考えられ、モデル生物としてのメダカを対象にして、この酵素の意義を知るとともに関連する疾患に対する薬剤を探索するとして用いることを計画している。この目的を達成するために、メダカの TGase について、該当する遺伝子を検索し、その酵素としての性状解析に加え、変異個体の作製を行った。

メダカの cDNA およびゲノムデータベースを基に、哺乳類の各アイソザイムの遺伝子配列に類似する遺伝子群を検索した。その結果、メダカには 7 種のアイソザイムが存在し、哺乳類の血液凝固に関わる Factor XIII (Ol TGB)、表皮形成に必須な TG1(Ol TGK1, Ol TGK2, Ol TGK3)、幅広い組織に分布し多様な機能をもつ TG2(Ol TGT)について明確なオルソログを見出した（括弧内がメダカ酵素の名称）。

それぞれを大腸菌または昆虫細胞で組換えタンパク質として発現精製を行い、いずれも哺乳類の酵素で見られる酵素活性や活性化の特徴を保存していることを明らかにした。特異的な抗体を得て、生化学的な解析を進めると共に、ゲノム編集法により正常な遺伝子が発現しない変異個体を作製した。

いずれも外見は正常であったが、Ol TGB(Factor XIII に相当)の変異個体は、本来血液中で重合される不溶化フィブリンが生じないことを示し、同時に骨形成に異常を見出した。Ol TGK1 および Ol TGK2（TG1 に相当）変異では、稚魚の段階で食塩含有の水中で生育阻害が観察され、表皮形成に異常が生じると考えられた。Ol TGT(TG2 に相当)の場合には、時間当たりの遊泳距離が短く、運動能力が劣ることがわかった。現在、これらの特徴を活用して、関連疾患研究や有用因子の発見につながるシステム確立をめざしている。

(1) PLoS One 10(12) 0144194 (2015) (2) Biosci. Biotechnol. Biochem. 81, 469 (2017)
(3) FEBS J. 284, 2843 (2017)

transglutaminase, coagulation, skin

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY11-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:25～ A04 会場

メダカでのゲノム編集の基礎と水産業への応用
Genome editing in medaka and its application to aquaculture
○木下 政人 (京都大農)
○Masato Kinoshita (Kyoto Univ.)

ゲノム編集技術は、基礎科学だけでなく応用科学や産業にも非常に有用な技術である。我々はこれまでに、メダカをモデルとして魚類での効率的なゲノム編集技術の開発を行ってきた。そして、これらを養殖業に活用するべくマダイ及びトラフグを用いてゲノム編集技術を用いた新品種の作製を行ってきた。本発表では、これらの成果を紹介する。

1） バックボーンプラスミドの選択：理由は明らかになっていないが TALEN RNA や Cas9 RNA の合成には、pCS2+ を用いることでゲノム編集効率が上昇する。

2） マイクロホモロジー修復を利用した効率的な遺伝子破壊方法：遺伝子を破壊する一つの方法にフレームシフト変異を導入する方法がある。魚類のゲノム編集においては、1 個体内で複数の変異パターンがモザイク状に存在するのが一般的である。そのため遺伝子破壊系統を樹立するためには、いかにフレームシフト変異を優先的に引き起こすかが重要となる。

3） メダカにおけるノックイン方法：ゼブラフィッシュではマイクロホモロジー（25 塩基程度）を介して効率的に、ゲノム上の任意の部位に遺伝子などを挿入するノックインが可能である。しかしながらメダカでは、マイクロホモロジーでは効率的なノックインは行われず、より長い相同配列が必要である。

4） ゲノム編集技術を用いた筋肉増量マダイの作出：メダカで得られた上記の知見を活用し、ミオスタチン遺伝子が破壊された骨格筋量増量マダイ系統を作出した。親魚の選別方法や Heteroduplex Mobility Assay を用いたノックアウト個体の選抜方法を紹介する。

5） ゲノム編集技術を用いた高成長トラフグの作出：食欲に関連する遺伝子を破壊することにより、成長・成熟の早いトラフグの作出を試みており、その途中経過を紹介する。

6） ゲノム編集を用いた養殖・育種の課題と展望：ゲノム編集技術が開発されてから日が浅く、社会の認知度や理解度はまだまだ高くない。この技術を食糧生産・新品種作製に用いるには、一般社会に受容される必要がある。そのためには、安全性の担保や規制などが課題となると考えられる。しかしながら、本技術により短期間での優良品種作出が可能となるため、水産業の発展に貢献すると考えられる。

medaka, red sea bream, tiger puffer

発表責任者：木下政人（kinoshit@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY11-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A04 会場

メダカがシアル酸無しでは生きられない事情

Sialic acids are essential for survival of medaka during embryogenesis

○北島 健（名大生物機能セ）
○Ken KITAJIMA (Nagoya Univ. BBC.)

糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の最末端に位置するシアル酸（Sia）は、生物の一生において時間・空間特異的に発現制御されて様々な機能を担っている。マウス胚の生存においてシアル酸が必須であることは証明されているが、その理由は殆ど知られていない。この疑問に答えるために、我々は、脊椎動物のモデルとしてメダカに着目して、シアル酸代謝に関わる酵素や輸送体の欠失や変異が及ぼす効果を個体レベルで解明する研究を行っている。シアル酸は脊椎動物の主要な糖残基であるのに対して、ショウジョウバエではきわめて限定された時期に発現する微量糖であるし、線虫にはその存在は知られていない。シアル酸はヒトの病気に深く関わる糖であることが知られており、メダカはヒトの病気の研究のモデル生物として、マウスに次ぐ有用な生物と言っても過言ではない。今回はシアル酸の代謝酵素として、CMP-シアル酸合成酵素 (CSS) とα2,6-シアル酸転移酵素（α2,6-ST）に着目した研究において最近明らかになってきた興味深い知見について述べる。CSS については、まず、その遺伝子の点変異体をもつメダカを TILLING 法によって作製した。CSS はシアル酸転移酵素の供与体基質である CMP-Sia の合成を触媒する酵素で、シアル酸をもつ複合糖質の生合成に必須酵素であるため、CSS 活性不全の変異体が得られればシアル酸残基の重要性を個体レベルで探索することができる。メダカ CSS 遺伝子のエクソンに点変異をもつ配偶子遺伝子を選別した。それらの変異体酵素を大腸菌で発現させて in vitro 酵素活性を測定したところ、点変異の位置は異なるものの活性が半減する 2 つの変異体を見出した。興味深いことに、これらの変異体の一方では孵化前の胚において形態異常が観察されて致死となるのに対して、もう一方では孵化後 1 ヶ月までの幼魚として生長後、致死となることが判明した。両者がいずれも胚あるいは幼魚の段階で致死となることから、CMP-シアル酸あるいはシアル酸はメダカ個体の発生の進行と生存の維持に重要であることが明らかになった。また、α2,6-ST はシアル酸をα2,6-結合でガラクトース残基に転移する転移酵素であることが知られている。メダカには 2 種類の酵素が存在し、それぞれの遺伝子欠失メダカを作製した。これらも一方が孵化前後に致死となるのに対して、もう一方では孵化後 1 ヶ月までの幼魚として生長後、致死となった。このようにシアル酸代謝の酵素が異なる発生段階において重要性をもつことが明らかにされてきており、本シンポジウムではその意義について議論したい。

sialic acid, vertebrate, medaka

発表責任者：北島健（kitajima@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY11-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:25～ A04 会場

メダカを用いた創薬スクリーニングのための基盤技術の開発

Development of basic technology for drug screening using medaka

○出口 友則（産総研バイオメディカル）
○Tomonori Deguchi (BMD, AIST)

ゲノム解析が進み多くの疾患原因因子が解明されたこと、また、何十万という化合物を一気に合成できるコンビナトリアル・ケミストリーが確立されたことにより、医薬品開発の基礎研究段階では、これらの原因因子をターゲットとする in vitro の分子標的スクリーニングが主流である。しかし、この手法により医薬品開発が一気に加速することが期待されたが、抗体医薬や一部のキナーゼ阻害剤を除き、期待された成果が見出されていないのが現状である。特に、in vitro の分子標的スクリーニングでのヒット化合物が、細胞レベルで活性を発現しないケースが多く、そのため、最近では、細胞等を用いた表現型スクリーニングへの回帰が見られる。表現型スクリーニングの究極は、個体レベルでのスクリーニングであるが、マウスのような小型動物であっても、多量の化合物量を必要とし、また膨大なコストがかかるため、開発化合物の評価にしか適用出来ない。さらに、非臨床試験段階において動物実験は必須であるが、近年、哺乳類動物の使用に対する規制が強化されている。そのため、欧米では安価かつスループットの高い個体レベルでのスクリーニングの要望に応えるため、最も小型な「脊椎動物」であるゼブラフィッシュを用いた創薬スクリーニングが進められている。我々は、10年以上前からこの現状を予見し、メダカを用いた創薬スクリーニングのための基盤技術の開発を行ってきた。本講演では、創薬スクリーニングにおいてゼブラフィッシュではなくメダカを使用する利点、疾患モデルメダカやその病態変化を光学的に高速で解析するために組織可視化したメダカ、そして、多数のメダカ胚もしくは稚魚を高速でスクリーニングするシステムについての発表を行う。

medaka, drug screening, in vivo imaging

発表責任者：出口友則（tomonori-deguchi@aist.go.jp）

講演番号：4SY11-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A04 会場

メダカを用いた社会障害の原因となる分子基盤の解析

Study on molecular basis underlying social disorder using medaka fish

○竹内 秀明（岡大・院自然）
○Hideaki Takeuchi (Okayama Univ.)

ヒトを含む社会性動物は集団を形成する。集団内の各メンバーは社会に適応するために、他者に対する行動を社会関係や外界環境に応じて、適切に決定していく必要がある。そのために各メンバーは他者を認知･識別して、他者との社会関係を理解し、自己の生理状態や外界環境の情報を統合して、社会的な意思決定を行う。このような社会適応能力に関わる高次脳機能は社会的コンピテンスと呼ばれる。これまで「社会的コンピテンス」の研究はヒトやサルを中心に進められてきた。しかし 1999 年以降になってグッピーやシクリッドも高度な個体認知能力を持つことが示され、硬骨魚類にも「社会的コンピテンス」が存在することが示唆された。そこで本研究では魚類の「社会的コンピテンス」の分子神経基盤を解明し、脊椎動物の進化的ルーツを探る目的で、2005 年からモデル生物であるメダカを用いて社会行動実験系を確立した。これまでに、視覚刺激依存に誘導される群れ行動(1)、社会的学習(2)、メスの配偶者選択(3,4)、メスを巡るオス間競争を定量化する行動実験系(5)を確立した。その結果、メダカは個体認知に基づく高度な社会行動を示すことを発見した。例えば、性成熟したメスメダカは前から見ていたオスを視覚記憶して、そのオスを配偶相手として受け入れ、新規に出現したオスを拒絶する傾向があることを見出した。このことから、オスとの社会関係（相手を視覚記憶しているか否か）が、メスの配偶相手の受入れ・拒絶の行動スイッチングに影響を与えることが分かった。さらにメダカ変異体を用いた行動解析により、神経ペプチド（GnRH, オキシトシン）が正常な社会行動の発現に必要であることがわかった。本シンポジウムでは行動解析から明らかになったメダカの社会認知機能とその分子神経基盤を紹介したい。またヒト社会障害の原因となる分子基盤の解明にメダカがどのように役に立つのかについても議論したい。

参考文献

(1) *PLoS ONE* **5**, e11248 (2010); (2) *PLoS ONE* ***8,*** *e71685* (2013); (3) *Science* **343***,* 91-94 (2014); (4) *eLife*, **6**, 24728 (2017); (5) *PLOS Genetics* ***11,*** *e1005009* (2015).

Social behavior, Oxytocin, GnRH

発表責任者：竹内秀明（takeuchi@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4SY11-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:35～ A04 会場

メダカの色素細胞をモデルとした細胞分化制御機構の研究

Study on mechanisms controlling stem cell differentiation using medaka as a model animal

○橋本 寿史[1]、成瀬 清[2] ([1]名古屋大生物セ、[2]基生研)
○Hisashi Hashimoto[1], Kiyoshi Naruse[2] ([1]Biosci. Biotech. Ctr. Nagoya Univ., [2]Nat. Inst. Basic Biol.)

幹細胞から多様な細胞種が産生される細胞分化の仕組みを理解することは発生学の根本的な課題の一つである。我々のグループは、メダカおよびゼブラフィッシュにおける神経堤幹細胞から色素細胞への分化をモデルとして、細胞運命決定の分子機序を遺伝学的に解析している。色素細胞の分化を制御する候補因子として、Sox (Sry-related HMG box)や Pax (Paired-type homeobox)といった転写因子が挙げられるが、本発表では Sox5 や Sox10、Pax3、Pax7 などの変異体の表現型解析から得られた成果を紹介する。

色素細胞は、ほ乳類や鳥類において黒色素細胞の一種類しか存在しないが、魚類ではほとんどの種において３種類以上のサブタイプに多様化しており、メダカには黒、虹、黄、白色の４種類が、ゼブラフィッシュには白色を除いた３種類が存在する。白色素細胞は比較的限られた魚種にしか存在しない細胞種であり、その有無はメダカとゼブラフィッシュの色素細胞発生の最も特徴的な種間差となっている。我々のこれまでの研究から、白色素細胞は黄色素細胞と共通の前駆細胞（黄白共通前駆細胞）から分化する近縁細胞であることが判明している。ゼブラフィッシュ *sox5* 変異体が目立った異常を示さなかった一方で、メダカ *sox5* 変異体は黄色の欠損と白色の過形成を示したことから、メダカにおける黄色と白色の細胞系譜の分岐には Sox5 が重要な役割を演じると考えられる。メダカ黄白共通前駆細胞のうち Sox5 陽性の細胞集団は黄色に、Sox5 陰性の集団は白色に分化したことは、Sox5 が黄白の運命決定の分子スイッチとして機能することを示唆する。

また、メダカおよびゼブラフィッシュにおいて、すべての色素細胞種の発生に Sox10 が必要であるが、Sox5 は概して Sox10 の作用を阻害的に調節することが分かった。しかしながら、メダカの黄白系譜では Sox5 は Sox10 と協調的に働き、黄色の分化を促進し白色の分化を抑制した。さらに、Pax3 と Pax7 は、メダカでは黄白色への分化を、ゼブラフィッシュでは黄色への分化を促進することが明らかとなった。

以上の結果から、魚類における色素細胞種の多様性は Sox や Pax の系譜ごとに異なる作用によって生成されていると考えられた。また、メダカ Sox5 がゼブラフィッシュでは見られない機能を持つことは、メダカが白色素細胞を獲得した進化的原動力の一つである可能性を示唆する。メダカは *sox5* 遺伝子の使い回しにより黄色の系譜を分岐させ、白色素細胞を新たに獲得したものと推察できる。

Pigment cell, Fate specification, Transcription Factor

発表責任者：橋本寿史（hsshsmt@bio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY12-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A05 会場

遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産の現状と課題

Progress in the production of recombinant proteins using transgenic silkworms

○瀬筒 秀樹 [1,2] ([1] 農研機構、[2] 東大新領域)
○Hideki Sezutsu[1,2] ([1]NARO, [2]Univ. Tokyo)

現在、日本の強みである「高度な養蚕技術」と「カイコのバイオ技術」を組み合わせることによって、カイコ・シルク新産業（＝新蚕業）を創出する動きが活発化している。国産技術である遺伝子組換えカイコを用いた有用タンパク質や新しいシルクの生産技術の開発が急速に進んでおり、既に一部は実用化され、大量飼育装置の開発や、大規模工場や農家における飼育に向けた取り組みも行われ、衰退した日本の蚕糸業から新産業への転換（＝蚕業革命）が起きようとしている。農研機構は、そのコア機関として、積極的な産官学連携によって基盤技術開発と普及に取り組んでいる。その取り組みの中でも、特にバイオ医薬品、体外診断用医薬品、化粧品等の原料となる組換えタンパク質を、遺伝子組換えカイコで安価で安定的に大量生産する試みに大きな期待が寄せられている。遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産系は、シルクタンパク質（繊維タンパク質のフィブロインおよび糊状タンパク質のセリシン）を大量に合成して内腔に分泌・貯蔵する「絹糸腺」という器官で、トランスポゾンベクターで組み込んだ外来遺伝子を発現させて外来タンパク質をセリシン層中に分泌させ、繭または絹糸腺から抽出する系が主に用いられている。組換えタンパク質の種類毎に発現量は異なるが、カイコ 1 頭（繭 1 個）あたり 100μg から 10 数 mg を生産可能であり、1 頭あたりの餌（人工飼料）のコストは 20 円程度であるため、低コスト生産系といえる。セリシンは水溶性であるため、組換えタンパク質の抽出・精製が容易であり、発現量の個体ロット間差が少なく、生産スケールの変更が容易という利点がある。また、組換えウイルスベクターを用いず、ヒト感染性のウイルスも知られていないため、基本的にはウイルスフリー生産系である。これまで既に、ニットーボーメディカルからヒトと動物用の体外診断用医薬品が製品化され、免疫生物研究所は、化粧品や試薬等を製品化し、アステラス製薬とフィブリノゲンの実用化等を進めている。遺伝子組換えカイコでは、IgG 型抗体等の複雑な構造のタンパク質も作りやすく、活性も高いため、ヒトや動物用の抗体医薬品の実用化が現在期待されている。今後、各種規制への対応や、需要と生産体制の拡大が鍵となるが、政府の取り組みとして、AMED 創薬基盤推進研究事業や、農水省・経産省等による「農業と生物機能の高度活用による新価値創造に関する研究会」で、カイコ由来バイオ医薬品の品質管理戦略等を検討中である。また、農林水産省委託プロジェクト研究「蚕業革命による新産業創出プロジェクト（2017～2021)」において、農研機構が中心となり、有用物質生産による新産業の創出と拡大を進めている。本講演では、上記を紹介しながら、遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産の現状と課題について発表する。

transgenic silkworm, recombinant protein production, revolution of sericulture

発表責任者：瀬筒　秀樹（hsezutsu@affrc.go.jp）

講演番号：4SY12-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A05 会場

カイコを使用した動物用医薬品の生産

Manufacturing of veterinary medicines using the silkworm expression system

○田中 剛（東レ株式会社　愛媛工場　動物薬室）
○Tsuyoshi Tanaka (Toray Industries, Inc.)

インターフェロン（IFN）は、病原体の侵入や腫瘍細胞の刺激に反応して細胞が分泌するサイトカインと呼ばれる生体防御・免疫機能に関与するタンパク質の一種である。1954 年、長野と小島によってウイルス抑制因子として発見され、1957 年、Isaacs と Lindenman により「Interferon」と命名された。IFN は、主として抗ウイルス作用、抗腫瘍作用および免疫調整作用があり、医療では B 型慢性肝炎や C 型慢性肝炎、脳腫瘍やメラノーマ等の治療に使用されている。

今日、犬猫は単なるペットではなくコンパニオンアニマル（伴侶動物）として位置づけられ、予防薬や治療薬など獣医療の充実に関心が高まっている。当社では、1993 年にネコカリシウイルス感染症（猫風邪）を適応とするネコインターフェロン（FeIFN）製剤をわが国で実用化し、1997 年にイヌパルボウイルス感染症（ウイルス性下痢症）を適応として追加承認された。また、2001 年にＥＵに承認されたのを皮切りに、世界 32 カ国で使用されている。さらに、抗ウイルス活性よりも免疫増強活性や免疫調節作用が主体とされるⅡ型 IFN のイヌインターフェロンγ製剤が犬のアトピー性皮膚炎の治療薬として承認された。

遺伝子組換え技術による FeIFN 生産法の開発にあたり、各種生産系を用いてその生産性を比較した。その結果、大腸菌、酵母、ハムスター細胞（CHO 細胞）、サル細胞（COS 細胞）を用いた一般的な方法と比べてカイコを用いた方法、とりわけカイコ体内に生産させる方法が極めて高い生産性を示すことが明らかとなった。カイコを用いた方法はカイコに感染するバキュロウイルスにインターフェロン遺伝子を組込み、5 齢幼虫に注射で接種する。人工飼料で数日間飼育することにより多量の FeIFN が体液中に蓄積する。カイコを切開し、体液を回収するが、このとき FeIFN が酸性で安定であること利用して塩酸の入った容器に回収し、組換えウイルスの不活化を行っている。続いて、中和、数種のアフィニティークロマトグラフィーによる精製および脱塩を行い、FeIFN 原薬を調製する。さらに、精製ゼラチン、Ｄ－ソルビトールを添加し、分注凍結乾燥後密封して製品を得る。

カイコは数千年かけて家畜化された昆虫であり、野外で生存する能力はない。また、カイコの病気は人や動物に感染しないとされていることから、カイコは安全且つタンパク質生産能に優れた生産宿主であると言える。本講演では IFN 製剤を生産するうえで経験したカイコ生産技術を実用化する際の課題について紹介する。

Silkworm, Interferon, Baculovirus

発表責任者：田中 剛（Tsuyoshi_Tanaka@nts.toray.co.jp）

講演番号：4SY12-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:55～ A05 会場

カイコ発現マラリアワクチン抗原の機能性について

Productivity and immunogenicity of silkworm expressed malaria vaccine antigen

○宮田 健[1]、李 在萬[2]、日下部 宜宏[2] ([1]鹿児島大学農、[2]九州大農)
○Takeshi Miyata[1], JM Lee[2], Takahiro Kusakabe[2] ([1]Kagoshima Univ., [2]Kyushu Univ.)

感染症対策にはワクチン開発が非常に重要である。これまで開発されてきたワクチンは主に、弱毒生ワクチンや不活化ワクチンであるが、近年、組換え技術によって作出されたタンパク質をベースにしたサブユニットワクチン（コンポーネントワクチン）の需要が高まってきている。理由はワクチンの安全性だけでなく、従来の方法では対応できない感染症が存在するからである。例えば、マラリア原虫のような寄生虫疾患に対するワクチン開発の場合、生ワクチン、不活化ワクチン等の既存の手法では、寄生虫の大量製造の観点から開発が難しいこともある。そこで、組換えタンパク質抗原をベースにしたサブユニットワクチン開発の重要性が大きくなってくる。しかし、寄生虫に対する有効なワクチン候補抗原の多くは寄生虫の表層構造タンパク質であり、複雑な立体構造を保持している場合がある。例えば、三日熱マラリア原虫に対するワクチン候補抗原である Pvs25 は三日熱マラリア原虫の蚊ステージにおける ookinete の表層構造タンパク質で、計 11 個のジスルフィド結合によって構造が保持された複雑な構造である。このようなジスルフィド結合を多く含むタンパク質を組換え体として適切に発現させる場合、大腸菌や枯草菌といった原核生物には負担が大きく、酵母以上の発現宿主が必要になってくる。我々は、これまで酵母 *Pichia pastoris* を発現宿主として Pvs25 の発現を試みてきた。しかし、結果として、量および質的に不十分であり、ほとんどがジスルフィド結合のミスマッチした構造異性体が多く発現されることが分かった。そこで、ワクチン抗原の生産性向上を目的として、九州大学が保有するカイコを用いたタンパク質工場での Pvs25 発現を試みた。本発表ではカイコ発現 Pvs25 の生産量および質的な向上、またワクチン抗原としての機能性をあげるための分子デザインについても紹介する。

malaria, vaccine

発表責任者：宮田健（tmiyata@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4SY12-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A05 会場

カイコーバキュロウイルス系を用いて開発された動物用免疫療法薬“アレルミューン HDM”について

" Allermmune HDM" - a new immunotherapeutic drug for dogs developed using baculovius-silkworm system

○津久井 利広[1]、大隅 尊史[2]、阪口 雅弘[3]、辻本 元[2] ([1]ゼノアック、[2]東京大学大学院獣医学専攻、[3]麻布大学獣医学部)
○Toshihiro Tsukui[1], Takafumi Osumi[2], Masahiro Sakaguchi[3], Hajime Tsujimoto[2] ([1]Zenoaq, [2]The University of Tokyo, [3]Azabu University)

アレルゲン特異的免疫療法（減感作療法）は、唯一の根治療法と考えられ、最も効果的な治療法とされているが、使用する減感作抗原ワクチンのロット間のバラツキの問題など様々な制約を受けるなど、医薬品としての承認には乗り越えなければならないハードルが多い。

イヌにおいてアレルギー性皮膚炎は発生頻度の高い疾患であり、一旦発症すると生涯にわたって問題となる。そして、イヌのアトピー性皮膚炎の臨床症状は、ヒトのアトピー性皮膚炎と類似した臨床症状を呈することが知られている。

イヌにおけるコナヒョウヒダニの主要アレルゲン解析を行ったところ、Der f 2 が主要アレルゲンの一つと考えられた。そこで、我々は Der f 2 cDNA を挿入したバキュロウイルスをカイコに接種し、カイコ体液から精製した組換え Der f 2 タンパク質をプルランと結合させた Der f 2 プルラン結合体を作製した。

プルランとは、グルコースのみからなる多糖類の一種で、グルコース 3 分子がα1-4 結合したマルトトリオースがα1-6 結合で繋がった繰り返し構造をもつ高分子である。プルランと抗原タンパク質の相互作用として、抗原に対する IgE 抗体産生を抑制することや抗原に対する IgG 抗体産生を増強させることなど、Th 1 型免疫反応を誘導することが報告されている。

組換え Der f 2 プルランの結合体の IgE の反応性を ELISA で評価したところ、反応性が低下していることを確認した。さらに、イヌを用いた皮内反応においても、IgE の反応性の低下が認められた。

Der f 2 プルラン結合体は 1 週間ごとに 6 回皮下投与することとし、投与量は、0.1μg, 0.5μg, 1.0μg, 2.0μg, 5.0μg, 10.0μg と設定した。

症例イヌを用いた臨床症状を行い、改善効果を評価した。その結果、2014 年 4 月 7 日に、農林水産省より「コナヒョウヒダニアレルゲンープルラン結合体およびその製剤」（製品名：アレルミューン®HDM）として動物薬としての製造承認を取得した。2017 年には、韓国での製造承認を取得し、販売を開始した。

本減感作治療薬のように、精製したアレルゲンのみを用いた新しい製品の開発が可能になり、さらにアジュバントとしてプルランをアレルゲンに結合させることにより、抗アレルギー性免疫反応の誘導や減感作薬の安全性向上が認められ、より効果的で安全な減感作薬が期待される。

Immunotherapy, Dermatophagoides farimae, Allergy

発表責任者：津久井利広（tsukui-toshihiro@zenoaq.jp）

講演番号：4SY12-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:55～ A05 会場

組換えタンパク質生産に向けたカイコ糖鎖生物学

Bomyx mori glycobiology toward production of recombinant proteins

○藤山 和仁（大阪大学)
○Kazuhito Fujiyama (Osaka Univ.)

組換えタンパク質の効率的生産に向けた多様な宿主が開発されている。動物細胞（ＣＨＯ細胞など)、酵母、大腸菌に加え、現在では昆虫（培養細胞)、植物（培養細胞）にまで実用化が広がっている。生産については、生産性（量的問題）は重要であるが、宿主により翻訳後修飾、特に糖鎖修飾、が異なり、生産した組換えタンパク質の性状（質的問題）に影響する。昆虫について、カイコを用いた生産系は日本が優位な技術である。

そこで本シンポジウムでは、カイコの持つ糖鎖修飾機能に関する基本的な知見を示し、その知見にもとづく糖鎖改変技術の開発の実例について紹介する。

１．カイコの糖鎖修飾に関する基本的な知見

カイコにおける組換えタンパク質は、5 齢虫体の脂肪体あるいは絹糸腺、およびサナギで主として生産される。そこで、これら器官における糖タンパク質の糖鎖構造を解析した。幼虫とサナギでは糖鎖プロファイルに大きな差はなく、幼虫の器官では中腸、脂肪体、体液でほぼ同じプロファイルで、Gal あるいは Sia 残基のないパウチマンノース型構造であった。しかし、幼虫絹糸腺の糖タンパク質は、他とは異なり、特徴的な構造が主だった。糖鎖プロファイルは、器官特異的な糖鎖修飾機能に関する興味深い結果を示した。

２．カイコの糖鎖修飾機能改変技術の開発

カイコ幼虫では主たる糖鎖は、パウチマンノース型である。しかし、GlcNAc 転移酵素 1 および 2 の遺伝子は存在する。カイコには糖鎖修飾に関わる 4 種の N-アセチルグルコサミダーゼ GlcNAcase 遺伝子が存在し、GlcNAc 残基を分解することでパウチマンノース型となると考えられた。そのうち一つ FDL の遺伝子発現をノックダウンしても発育には問題がなく、転写量、酵素活性が減少し、同酵素阻害剤存在下で GlcNAc 含有糖鎖存在量が増加した。一方で、ヒト糖鎖構造をカイコで形成させる技術開発も試みられている。カイコが保持しないヒト由来糖鎖修飾酵素遺伝子（GalT など）を発現させ、Gal 型糖鎖の創成に成功した報告がある。

以上のように、カイコの持つ糖鎖修飾機能を調査した知見より、目的とする糖鎖構造の形成のための戦略を立てることが可能となる。カイコでヒトと生物学的機能が同等の組換え（医療）タンパク質生産へと繋がり、新しい「蚕業」の創出が期待できる。

glycobiology, Bomby mori, glycoengineering

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

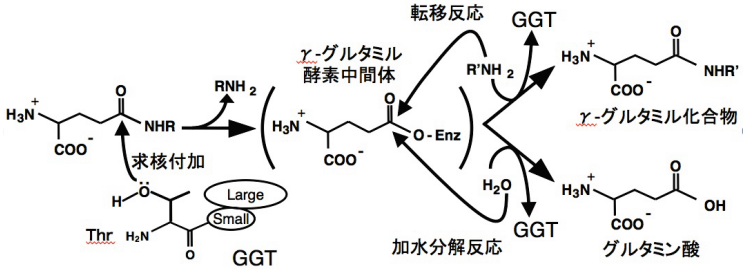
講演番号：4SY13-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A06 会場

はじめに：γ-グルタミルトランスペプチダーゼの紹介
Introduction of γ-glutamyltranspeptidase
○鈴木 秀之（京都工繊大）
○Hideyuki Suzuki (Kyoto Inst. Technol.)

γ−グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT; EC 2.3.2.2）は、肝胆道系疾患のマーカー酵素として広く臨床応用されており、多くの研究が行われてきた。GGT 研究の最近の進展について、各演者から紹介がある前に、この酵素の基本的な性質について紹介する。

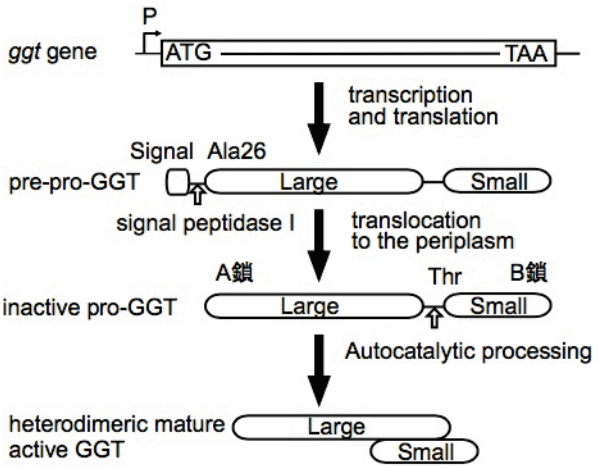
GGT の触媒する酵素反応

GGT はγ−グルタミル化合物のγ−グルタミル基をアミノ酸やペプチドに転移する反応とγ−グルタミル結合を加水分解してグルタミン酸を遊離する反応を触媒する。転移反応の至適 pH はアルカリ性側に、加水分解反応の至適 pH は酸性側にあるため、反応液の pH を調整することにより、いずれか一方の反応を選択的に進行させることができる。



GGT の成熟化

GGT は、バクテリアからヒトに至る多くの生物に見られ、グルタチオン異化の最初のステップを触媒する。分子量 40K と 20K の大小２つのサブユニットからなるヘテロダイマー構造をしているが、遺伝子は１つであり、１本の不活性型の前駆体ポリペプチドとして翻訳された後、自己触媒的プロセシングを経て、大小２つのサブユニットからなる活性型の酵素に成熟する。成熟型と前駆体の立体構造の比較から、大小サブユニット間の切断後、ダイナミックな構造変化を伴って活性中心の構造ができあがる。プロセシングにより新しくできる小サブユニットの N 末端の Thr 残基の側鎖の酸素原子が、プロセシング反応においても、酵素反応においても求核原子として働く。



プロテンγ−グルタミルトランスペプチダーゼ：トランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13)

GGT と基本的に同じ反応を触媒するが、酵素反応における求核原子は Cys 残基の側鎖の硫黄原子であり、γ−グルタミル基供与体はタンパク質のグルタミン残基である。血液凝固因子である Factor XIII やタンパク質のポリアミン化による活性の調節など多様な機能が知られている。

glutathione, γ-glutamyltransferase, γ-glutamyl peptide

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：4SY13-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:20～ A06 会場

立体構造に基づいたγ-グルタミルトランスペプチダーゼの反応機構とこの阻害剤開発に向けて
Reaction and inhibition mechanisms of γ-glutamyltranspeptidase based on its structures

○和田 啓（宮崎大医）
○Kei Wada (Univ. of Miyazaki)

生体にとって必須の抗酸化物質であるグルタチオン（GSH; γ-Glu-Cys-Gly）は、グルタミン酸側鎖を介した特殊なペプチド結合（γ-グルタミル結合）を有し、一般的なプロテアーゼによる分解を受けない。γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、GSH のγ-グルタミル結合を切断できる唯一とも言える酵素であり、GSH 代謝と生体異物解毒の初期反応を担う鍵酵素としての役割を果たす。本酵素 GGT は、動脈硬化症や腎障害、パーキンソン病、ガン細胞の多剤耐性など広範囲の疾患に深く関与している。GGT はグルタチオンなどのγ-グルタミル化合物からγ-グルタミル基を切断し、他のアミノ酸やペプチドに受け渡す転移反応、およびγ-グルタミル基を加水分解してグルタミン酸を生成する反応を触媒する。これらの反応はγ-グルタミル化合物から引き抜かれたγ-グルタミル基が GGT に結合した「γ-グルタミル酵素中間体」を経て進行すると信じられてきた。本研究では、GGT の反応機構および阻害剤結合を構造学的に追跡し、GGT の分子機構に迫った。

本研究では、基質の結合様式や反応機構の詳細を明らかにするために大腸菌、枯草菌およびヒト GGT の X 線結晶構造解析を進めてきた。例えば、GSH を含む溶液に短時間(10 秒)浸けた結晶を急速凍結させることにより「γ-グルタミル酵素中間体」をトラップし、その構造を実験的に明らかにし、立体構造に基づいた GGT の加水分解反応機構を明らかにしている。また、新たに合成した基質アナログを用いることにより、転移反応機構の実験的な解明を進行中である。

さらに、GGT の新規阻害剤の開発に向けて、さまざまな阻害剤の結合機序/様式を明らかにしてきた。古典的な GGT 阻害剤であるアシビシンの結合様式を大腸菌 GGT を用いて決定し、阻害剤自体の構造変換を伴う新規な結合機序を提唱した。バクテリア GGT は一見すると同じ基質結合ポケットを持つように見えるが、枯草菌 GGT-アシビシンの構造からバクテリア GGT がもつ阻害剤結合様式の多様性が見えてきた。また、アシビシンの結合過程を経時的に捉え、阻害剤分子の結合機序を明らかにしている。

これらの立体構造を踏まえて、本酵素 GGT の分子機構の全容を議論させて頂く。

Glutathione, crystal structure, Ntn-hydrolase family

発表責任者：和田　啓（keiwada@med.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4SY13-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A06 会場

破骨細胞活性化因子としてのγ-グルタミルトランスペプチダーゼ研究の展開

gamma-Glutamyltranspeptidase as an osteoclastogenic factor

○新飯田 俊平（国立長寿医療研究センター）
○Shumpei Niida (National Center for Geriatrics and Gerontroloy)

γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)はグルタチオン代謝の主要酵素だが、たぶん肝機能マーカーとしての方がよく知られている。この酵素が骨代謝に関与していると言ってもなかなか信用してもらえない。実際、研究に携わった我々も未だに本当なのかと不安がよぎるが実験結果はそれを示唆している。GGT は新規骨吸収因子の探索で検出された複数の遺伝子の一つだった。同定した研究グループは興味を示さなかったので私たちが軽い気持ちで調べてみることにした。当時標準化されていたマウスの骨髄細胞の共培養系でテストした。結果は微弱であるが破骨細胞分化を促進するものだった。注目した点は、この活性は本来の酵素としての活性ではなさそうだ、ということだった。その後のトランスジェニックマウスを用いた結果も同様だった。それなら受容体があるはずと考えた。少しずつ実験を進め、ようやく TLR4 が受容体らしいと突き止めた。それでも疑問が残る。体内、特に腎臓にはたくさんの GGT が発現している。血中にも肝由来の GGT が検出される。それなのに健常者であるなら腎臓・肝臓で炎症を引き起こすことはない。しかし、高 GGT 血症をきたす胆管閉塞モデルラットの続発性骨粗鬆症は抗 GGT 抗体の投与で骨量減少に歯止めがかかった。アルコール多摂取では骨粗鬆症化が進む。この場合も血中 GGT は高値を示す。悪さをするのは細胞膜から遊離した GGT で、しかも閾値があるようだ。それなら GGT の関与はありうると思っている。研究の途中、アントシアニン摂取が血中 GGT 値を下げるという論文を目にした。GGT 依存性の破骨細胞形成への抑制効果のテストをしていたら、アントシアニンそのものに破骨細胞形成抑制効果あることを発見した。副産物の成果だが、この内容は以前この学会で発表させていただいた。偶然ばかりの研究成果だが、これらの研究について意見を頂戴できたら幸いである。

GGT, osteoclastogenesis, bone resorption

講演番号：4SY13-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:40～ A06 会場

ニンニクフレーバーの前駆体生成に関与するγ-グルタミルトランスペプチダーゼ

γ-Glutamyl transpeptidases for the biosynthesis of the flavor precursors in garlic

○吉本 尚子（千葉大院薬）
○Naoko Yoshimoto (Chiba Univ.)

ネギ属植物ニンニクが持つ特徴的なフレーバーや健康機能は、アリイン（*S*-アリルシステインスルホキシド）等の含硫二次代謝物に起因する。20 世紀後半に行われたトレーサー実験の結果から、アリインはグルタチオンの硫黄原子への炭素鎖付加反応、グリシル基脱離反応、酸化的脱炭酸反応を経て生じた生合成中間体 γ-グルタミル-*S*-アリルシステインが、γ-グルタミル基脱離反応と *S*-酸化反応を受けて合成されると推定されたが、これらの反応を触媒する酵素の実体や反応順については長い間不明であった。本講演では、最近我々が行ったアリイン生合成における γ-グルタミル基脱離反応を触媒する γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）と *S*-酸化反応を触媒するフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）の同定研究について紹介したい。

植物において GGT は酸化型グルタチオンやグルタチオン *S*-抱合体等の幅広い γ-グルタミル化合物の γ-グルタミル基脱離反応に関わることで知られる。我々はアリイン生合成における γ-グルタミル基脱離反応を GGT が触媒すると推測し、ニンニクで発現する 3 つの GGT 遺伝子（*AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3*）を単離し機能解析を行った。その結果、AsGGT1、AsGGT2、AsGGT3 はどれも推定生合成基質 γ-グルタミル-*S*-アリルシステインの γ-グルタミル基を脱離して推定生合成中間体 *S*-アリルシステインを生じる活性を持つことが示された。しかしながら、AsGGT1、AsGGT2、AsGGT3 の γ-グルタミル-*S*-アリルシステインに対する親和性は大きく異なることから、これら 3 つの GGT はアリイン生合成において異なる役割を持つ可能性が考えられた。ニンニク植物体では、緑葉においてグルタチオンから活発にアリインが生合成されること、鱗片には γ-グルタミル-*S*-アリルシステインが大量に蓄積しているが発芽に伴い γ-グルタミル基脱離反応と *S*-酸化反応を受けてアリインが生成することが知られている。mRNA 発現量の解析の結果、γ-グルタミル-*S*-アリルシステインに対して最も高い親和性を示す AsGGT1 は緑葉におけるアリイン生合成に、γ-グルタミル-*S*-アリルシステインに対して最も親和性が低い AsGGT3 は発芽時の鱗片において貯蔵されていた γ-グルタミル-*S*-アリルシステインのアリインへの変換に主に関与することが示された。

一方、GGT により生じた生合成中間体 *S*-アリルシステインは、酸化酵素による *S*-酸化を受けてアリインに変換されると考えられる。我々はシロイヌナズナにおいて含硫二次代謝物グルコシノレートの *S*-酸化反応を触媒する FMO と配列相同性が高いニンニクの FMO である AsFMO1 について機能を解析した。その結果、AsFMO1 は推定生合成基質である *S*-アリルシステインを立体特異的に *S*-酸化し、天然型アリインを生成する活性を持つことが示された。*AsFMO1* mRNA は緑葉でも発芽鱗片でも発現していることから、どちらの組織においても AsFMO1 は GGT により生じた *S*-アリルシステインのアリインへの変換を担っていることが示された。

alliin, biosynthesis, γ-glutamyl transpeptidase

発表責任者：吉本尚子（naokoy@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4SY13-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:20～ A06 会場

トランスグルタミナーゼによる食品の物性制御～乳分野への利用拡大に向けた取り組み

Basic properties and Applications of Transglutaminase in the Dairy Industry

○三輪 典子（味の素株式会社）
○Noriko Miwa (Ajinomoto Co., Inc.)

「食感」（テクスチャー）は、食品のおいしさを構成する重要な要素の一つである。テクスチャーの改良技術としては、加熱、加圧、撹拌等の物理的処理や増粘剤、ゲル化剤等の食品添加物によるものなどが挙げられるが、酵素的にも改良が可能である。酵素による方法は、反応の特異性が高い、副反応が少ない、高温や高圧などが不要で省エネルギー（環境負荷が少ない）である等、多くの利点が挙げられ、食品分野では使い方次第で極めて有効である。

トランスグルタミナーゼ（以下 TG と略す）は、ポリペプチド鎖中のグルタミン残基のγ-カルボキシアミド基とリジン残基のε-アミノ基間の架橋結合を触媒し、ε-(γ-グルタミル)リジン結合（以下 GL 結合）を形成する酵素である。GL 結合を介してタンパク質中にネットワーク構造が生ずることにより、タンパク質溶液の粘度増加やゲル化を起こすことが可能である。当社では２０年来、食品の物性や食感の改良を目的に、TG と各種素材を配合して各食品用に最適化した食品物性改良剤「アクティバ®」シリーズを販売しており、食肉加工、水産加工、成型（接着）など、様々な食品製造に用いられている。

牛乳中のタンパク質は、優れた栄養源であるとともに、TG 反応性の観点からも良好な食材の一つである。元来、乳タンパク質の様々な機能特性は食品加工の上で重要な役割を果たしているが、TG を利用することにより更なる付加価値の向上が期待される。

牛乳のタンパク質の約 80%を占めるカゼインは、ランダムコイル状の変性構造をとっており、TG の反応性が高いタンパク質とされるのに対し、約 20%のホエータンパク質は球状構造のため、TG 反応性が低い。また、TG 処理したカゼインナトリウムは、ゲル化性だけでなく、乳化性も高まることが分かっている。原料の牛乳を TG 処理することにより製造されるヨーグルトでは物性強化や離水抑制、チーズでは歩留まり向上効果も認められる。このように、乳タンパク質への TG の作用に関する基礎知見や各種乳製品への TG の応用については多くの知見が蓄積されている。

本発表においては、TG の基本特性をはじめ、乳タンパク質への TG 反応性及び TG による機能改変について紹介する。更に、乳分野への TG 用途拡大に向けて、これまで我々が直面してきた技術課題とその解決のための技術開発の事例を述べてみたい。

Transglutaminase, milk protein, food texture

発表責任者：三輪典子（noriko_miwa@ajinomoto.com）

講演番号：4SY14-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A07 会場

微生物機能を活用する物質生産プロセスの実用化にかける思い
Thinking on industrial application of microbial function to material production process

○小川 順（京大院農・応用生命）
○Jun Ogawa (Div. Appl. Life Sci., Grad, Sch. Agric., Kyoto Univ.)

多様な遺伝子資源である微生物が有する物質生産ポテンシャルは無限である。生育を支持する培地での培養時に観察される生産物は数限りなく、また、易・難分解性を問わず、様々な化合物が微生物代謝を介して多様な化合物に変換される。これまでも、これらの微生物機能に立脚した発酵生産技術、微生物・酵素変換技術が種々開発されてきた。さらに現代においては、合成生物学技術に支援され、生産対象は天然物の域を超えてきている。

しかしながら、観察される微生物機能のすべてが実用化に結実するわけではない。微生物機能が物質生産プロセスとして実装されるためには、越えねばならないいくつかの壁がある。この壁の克服に関して、筆者がプロセス開発において留意している要素に、以下の 3 点がある。

１）生産対象に求められる物量、質、価格を満たしうる原料の選定
２）生産に必要な生物学的エネルギー・還元力の効率的獲得
３）代謝・酵素変換流速を目的産物の生産方向に収束しうる圧倒的な要素の導入

これらに対応すべく、微生物が持ち合わせねばならない能力として、多様な炭素・窒素源への対応能、強力な代謝活性とエネルギー産生に担保される活発な生育、化合物の迅速な取り込み・排出能力、などが挙げられよう。もちろんその能力を引き出すための諸条件の最適化も重要である。

加えて、研究開発スピードを加速することも、競争を勝ち抜く観点から，強く求められている。ゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームに代表されるオミクス技術や各種分析技術の高度化がこれをサポートするかたわら、開発対象となる微生物における遺伝子・ゲノム改変技術の革新が必須となる。

これらの諸要素を考慮すると、*Corynebacterium glutamicum*に代表されるコリネ型細菌が持つ潜在能力をあらためて理解することができよう。

その物質代謝の多様性、活発な生育、エネルギー産生能の高さに基づき筆者らが進めてきた研究を例とて紹介しながら、この思いをあらためて共有するとともに、今後の微生物機能を活用する物質生産研究を展望したい。

fermentation, microbial transformation, enzymatic transformation

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY14-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:20～ A07 会場

ビオチン要求性細菌における脂肪酸からビオチンへの代謝変換

Metabolic conversion from fatty acids to　biotin in biotin-auxotrophic bacteria

○池田 正人 (信州大農)
○Masato Ikeda (Shinshu Univ.)

ビオチン（ビタミン B7）は炭酸転移反応に関わり、特に脂肪酸合成に重要な役割を担う。生体膜や皮膚の形成に必要で、私たちヒトや動物もそれが不足すると皮膚疾患が起こる。このため、飼料添加物や医薬、食品、化粧品等、広い用途がある。このシンポジウムのテーマであるコリネ型細菌との関係で言えば、グルタミン酸発酵のキーファクターであることは言うまでもない。

有用な代謝産物でありながら発酵法が確立されていないものは少なからずあるが、ビオチンもその１つである。1960 年代から大手の企業を中心として生産菌の育種が盛んに行われたが，育種は困難を極め、結局、高生産菌の取得には至らず、いずれも研究を中断している。従って、ビオチンは従来、原料を石油に依存して多段の工程から成る化学合成法により製造されている。その名に Bio の文字を含むにも関わらず、である。

我々は、最近、コリネ型細菌がただ一つの遺伝子変異で糖から長鎖脂肪酸を過剰合成し、かつそれを菌体外に分泌することを見出し、本菌種に長鎖脂肪酸生産菌としてのポテンシャルがあることを報告した[Appl Environ Microbiol **79:**6776 (2013)]。一方、コリネ型細菌に異種細菌の *bioF* と *bioI* を導入することで、ビオチン要求性を解除できることも見出している[Appl Environ Microbiol **79:**4586 (2013)]。ちょうどその頃、世界では、ビオチンの生合成研究に一つの進展があった。これまでビオチン前駆体のピメリン酸チオエステルがどうやって生合成されるかの詳細はわかっていなかったが、米国のクローナンらを中心とする研究により、脂肪酸合成経路に依存していることが明らかになってきた [Nat Chem Biol **6:**682 (2010); Mol Microbiol **104:**595 (2017)]。これを機に、我々は、新たな試みとして、コリネ型細菌を用いたビオチン生産菌の育種に着手した。ビオチン要求性細菌であるがゆえに、本菌種を用いたビオチン直接発酵の報告はこれまでにない。

過去のビオチン生産菌育種では、大腸菌、枯草菌、セラチア、あるいは自然界からスクリーニングした細菌を出発菌株として、ビオチンやアミノ酸等のアナログ耐性を付与する育種が常套手段であった。遺伝子組換え育種も行われているが、いずれにせよ、その狙いは、ピメリン酸チオエステルから始まるビオチン合成経路の強化であった。これに対し、我々は、ビオチン前駆体であるピメリン酸チオエステルの供給を主眼にして、その源流と考えられる脂肪酸経路に焦点を当てる。脂肪酸経路の代謝は本当にビオチン経路に繋がっているのか。脂肪酸経路の代謝をいかにしてビオチン経路に引き込むのか。その戦略と現在までの状況を報告する。

Corynebacterium glutamicum, Biotin, Fatty acids

発表責任者：池田 正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4SY14-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:45～ A07 会場

Corynebacterium glutamicum におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望
Exploring the impact of protein acylation on L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*

○古園 さおり [1,2] ([1] 東大生物工学セ、[2] 理研 CSRS)
○Saori KOSONO[1,2] ([1]UTokyo, BRC, [2]RIKEN-CSRS)

近年のゲノムワイドな解析から、ある代謝経路のフラックスとそれを担う代謝酵素の発現量との相関が低いことがしばしば見出されており、アロステリック調節や翻訳後修飾など「翻訳後レベル制御」の重要性が再認識されている。代謝フラックスと遺伝子発現のギャップは、*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産においても見出せる。*C. glutamicum* は Tween 40 添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰生産する。この時、グルコースからグルタミン酸合成に向かう代謝フラックスは上昇するが、それを担う代謝酵素の発現量は必ずしも上昇していない。我々は、グルタミン酸過剰生産条件で中央代謝経路酵素のアシル化修飾が変動することを見出しており(1)、こうしたアシル化修飾の変化が代謝酵素の翻訳後制御に関わる可能性や代謝フラックスに与えるインパクトを明らかにしたいと考え研究を進めている。本シンポジウムでは、グルタミン酸生産に重要な補充経路酵素や 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ制御因子 OdhI のアシル化修飾の機能解析(2, 3)について紹介しつつ、*C. glutamicum* を用いた有用物質生産に対しアシル化修飾の観点からどのようなアプローチが可能かについて展望してみたい。

1）Mizuno, Y. et al., 2016. *MicrobiologyOpen*. 5:152–173.
2）Nagano-Shoji, M. et al., 2017. *Mol. Microbiol*. 104: 677-689.
3）Komine-Abe, A. et al., 2017. *Biosci Biotechnol Biochem*. doi:10.1080/09168451.2017.1372182.

Corynebacterium glutamicum, L-glutamate overproduction, protein acylation

発表責任者：古園さおり（uskos@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY14-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:10～ A07 会場

物質生産の際の透過障壁としての細胞表層構造の解析
Analysis of cell surface permeability barriers of *Corynebacterium glutamicum*
THERESIA Natalia Maria[1]、松田 吉彦[2]、岩井 伯隆[1]、○和地 正明[1] ([1]東工大生命理工学院、[2]味の素（株）バイオ・ファイン研究所)
Natalia Maria THERESIA[1], Yoshihiko MATSUDA[2], Noritaka IWAI[1], ○Masaaki WACHI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Ajinomoto Co., Inc.)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、著量のグルタミン酸を培地中に生産する菌として分離され、グルタミン酸をはじめとするアミノ酸の工業的発酵生産に広く利用されてきた。近年、本菌のタンパク質分泌生産宿主としての価値が理解され、異種タンパク質生産系が開発されている。本菌は培地中にタンパク質をほとんど分泌しないこと、培地中のタンパク質分解活性がほとんどないこと、内毒素を生産しないことなどが、本菌を宿主として用いる利点として挙げられている。しかしながら、本菌は一般的なグラム陽性細菌とは異なり、長鎖脂肪酸であるミコール酸を主成分とする脂質二重膜をペプチドグリカン層の外側にもち、これがタンパク質分泌の際の透過障壁となっている。また、*C. glutamicum* の多くの株はミコール酸層のさらに外側に CspB タンパク質により構成されている S-layer を有しており、これも透過障壁として機能している。我々はこれまでに、抗体断片 Fab の分泌生産にあたって、CspB やペプチドグリカン酵素 PBP1a の欠損がその生産性を向上させることを見出してきた。さらに、溶菌酵素リゾチームの感受性が細胞表層の透過性の指標として有効であることを示した（Matsuda et al., 2014, Microbial Cell Fact.）。

ミコール酸層を持たないグラム陽性細菌である枯草菌と黄色ブドウ球菌、およびグラム陰性細菌である大腸菌を対照として、コリネ型細菌に特異的に作用する薬剤の探索を行った。その結果、カルシウムイオンのキレーターである EGTA が特異的にコリネ型細菌の増殖を阻害することを見出した。EGTA は *C. glutamicum* の増殖を濃度依存的に阻害したが、溶菌は引き起こさなかった。一方、EGTA とリゾチームを同時に作用させると溶菌が引き起こされた。これより、EGTA は *C. glutamicum* の細胞表層の透過性を上昇させ、リゾチームがミコール酸層を通過してペプチドグリカン層にまで到達していると考えられた。そこで、EGTA の細胞表層タンパク質に対する効果を調べたところ、EGTA 処理により S-layer 構成タンパク質である CspB や、ミコール酸層形成に関与するミコール酸転移酵素 CspA (CmytA)、CmytB、CmytC などが培地中に遊離されてくることが明らかとなった。その際に CspB は低分子化した数本のバンドとして検出されることから、プロテアーゼの作用を受けていることが判明した。これらのことより、カルシウムイオンが本菌の細胞表層の維持に必要なことが明らかとなった（Theresia et al., 2017, Arch. Microbiol.）。さらに、CspB の分解に作用するプロテアーゼの同定に成功した。当該プロテアーゼを欠損させることにより、分泌タンパク質の生産性や品質の向上に寄与することができると期待される。

Corynebacterium glutamicum , cell surface, permeability barrier

発表責任者：和地正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4SY14-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ A07 会場

リグノセルロース系バイオマスを包括的に利用したコリネ型細菌によるバイオモノマー生産

Utilization of lignocellulosic biomass for the production of aromatic building blocks for bio-based polymers by *Corynebacterium glutamicum*

川口 秀夫[1,3]、荻野 千秋[2,3]、○近藤 昭彦[1,2] ([1]神戸大院イノベ、[2]神戸大院工、[3]CREST JST)
Hideo Kawaguchi[1,3], Chiaki Ogino[2,3], ○Akihiko Kondo[1,2] ([1]Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Eng,. Kobe Univ., [3]CREST JST)

【背景・目的】 芳香族ポリマーであるポリベンズイミダゾール（PBI）は、高い耐熱性と機械的強度を示すスーパーエンプラであり、金属代替素材など多様な用途展開が期待されている。我々は、再生可能資源であるバイオマスから PBI 系新規ポリマーの原料となる 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid (3,4-AHBA)を生産する、一貫プロセスの開発を行っている。糖から 3,4-AHBA 発酵生産するために、工業的アミノ酸生産菌として知られるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* の代謝改変株を作製した。バイオマスを包括的に利用したバイオ 3,4-AHBA の生産を目的に、イネ科の C4 植物であるソルガムの搾汁液を炭素源とする直接発酵と、モデルセルロース系バイオマスとしての紙パルプを炭素源とする糖化後発酵（SHF）の、２つのプロセスを検討した結果を紹介する。尚、バイオ 3,4-AHBA からの PBI 合成を目的とする、発酵液からの 3,4-AHBA の精製については、本学会における齋藤駿らによる発表をご覧になって頂きたい。
【結果および考察】 コリネ型細菌を宿主に、放線菌 *Streptomyces griseus* 由来の grixazone 合成酵素をコードする 2 遺伝子（*griHI*）を発現させた遺伝子組換え株を作製した。作製した 3,4-AHBA 生産株は、解糖系代謝中間体 dihydroxyacetone phosphate とアスパラギン酸代謝物 aspartate semialdehyde の縮合反応により、グルコースから 3,4-AHBA 生合成が可能となった。ショ糖と微量のグルコース及びフルクトースを含むソルガム搾汁液からの直接発酵を検討した結果、ソルガム搾汁液はグルコースよりも高い 3,4-AHBA の生産性を示した（1.0 g/L）。搾汁液による 3,4-AHBA 代謝促進作用を分子量画分と添加試験により調べた結果、含有成分であるロイシンが促進作用物質であることを明らかにした。さらに、バイオマス残渣に含まれるセルロースから 3,4-AHBA を生産するために、紙パルプをモデルとする糖化後発酵を検討した。紙パルプに少量の緩衝液とセルラーゼ製剤（5 filter paper unit/g biomass）を添加して液化・糖化し、得られた酵素糖化液を基質とする糖化後発酵を行った結果、3 g/L の 3,4-AHBA を生産することができた。以上の結果より、バイオ 3,4-AHBA をバイオマスの搾汁液と残渣（リグノセルロース）いずれの原料からも生産できることを明らかにした。
【謝辞】 本研究は、CREST「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」および、文部科学省「先端融合領域イノベーション創出拠点形成」プログラム（iBioK）の支援を受けて実施した。

biomass, *Corynebacterium glutamiucm*, bio-based polymer

発表責任者：近藤明彦（akondo@kobe-u.ac.jp）

講演番号：4SY14-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A07 会場

高機能化コリネ型細菌によるバイオリファイナリー技術の創製

Development of biorefinery technology using functionally improved Corynebacteria.

○乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

我が国の化学製品は、ほとんどが石油を原料として製造されており、2017 年の「温室効果ガスインベントリ報告書」によれば、化学産業は産業部門の CO_2 排出量の約 16%、日本全体の総 CO_2 排出量の 4%を占めている[1)]。従って石油資源からバイオマスへの原料転換は喫緊の課題であり、バイオプロセス等の省エネルギーなバイオ技術の利用が期待されている。一方、このようなバイオ技術が生産分野に貢献する市場はバイオエコノミーと呼ばれ、その市場拡大が続いている。OECD 加盟国における 2030 年のバイオエコノミーは全 GDP の 2.7%になると予測され、その規模は約 200 兆円である[2)]。我が国においても、バイオ技術の分野におけるバイオ×デジタルの融合による化石資源に頼らない「炭素循環社会」の実現が国家戦略の一つとして挙げられており、高度に機能がデザインされた「スマートセル」によるバイオ化学品やバイオ素材の研究開発が今後急速に進展していくことが期待されている。

このような背景の下、我々はバイオマスを原料として、コリネ型細菌を用いたバイオ燃料・グリーン化学品製造技術開発を行ってきた。RITE では、各種アミノ酸等の工業生産に多用されてきたコリネ型細菌が、還元条件下では増殖は抑制されるものの代謝機能は維持され、糖類を代謝し有機酸を効率よく生成する現象を見出した。これを基に、増殖非依存型バイオプロセス「RITE Bioprocess」の開発を進めている。これまでに非可食バイオマスを原料とするバイオリファイナリー工業化に必須の要素技術である「混合糖の完全同時利用」、「発酵阻害物質への高度耐性」等は確立済みである。製品としては、バイオ燃料として、エタノール、ブタノール、グリーンジェット燃料、バイオ水素、グリーン化学品として、乳酸、コハク酸、アラニン、バリン、シキミ酸、フェノール等の高効率生産を報告してきた。最近我々は、コリネ型細菌が他の微生物と比較して、細胞毒性が高い芳香族化合物やアルコールに対して耐性が高いことを見出した。現在は、細胞毒性が強くこれまで発酵法では高生産が難しかった、ポリマー原料・香料・化粧品・医薬等の原料となる芳香族化合物等の生産技術開発に注力している。本講演では、このスマートセル創製技術と「RITE Bioprocess」のメリットを活かし、細胞毒性が強い、より高付加価値の芳香族化合物や、既存の代謝経路では生成が難しかったグリーンジェット燃料の生産技術等に関して、最近の研究成果について報告する。

1) NEDO TSC Foresight Vol.22、
2) 経産省 HP；http://www.meti.go.jp/main/60sec/2017/20170120001.html

metabolic engineering, biorefinery, smart cell

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：4SY14-7
講演日時、会場：3 月 18 日 11:25～ A07 会場

Microbial Cell-factory としての *Corynebacterium glutamicum* の魅力：アミノ酸からタンパク質、そして高分子核酸へ
Fascination of *Corynebacterium glutamicum* as a Microbial Cell-factory: From amino acids to proteins, and toward polymeric nucleotides
○安枝 寿（味の素（株）イノベーション研)
○Hisashi Yasueda (Ajinomoto Co., Inc.)

L-グルタミン酸の過剰生産菌として *C. glutamicum* が発見されてから約 60 年が経つ。この間に、ゲノム配列の解読による基盤遺伝情報の蓄積、各種の先進的な Genetic tools の開発、そして、Omics 技術および合成生物学の応用等による様々な菌株育種と培養法の改善により本菌株の産業的重要性は益々増している。なかでも L-グルタミン酸ナトリウムは、現在では全世界で年間に推定約 300 万トン程度が本菌株により生産され続けている。*C. glutamicum* は、その他にもアルコール類や有機酸類、バイオポリマー等の化成品の生産宿主株として数多く報告されてきている。これらの研究事例を通して、*C. glutamicum* は産業的な大規模培養の条件においても非常にロバストな菌株であり、その特徴ゆえに各種有用物質の Microbial Cell-Factory として魅力的な菌株と言えよう。

本発表の前半では、当社で検討されてきた代謝工学による L-グルタミン酸生産菌の育種研究と本菌株のタンパク質分泌生産系としての有用性を紹介する。まず、我々は、ビフィズス菌等にみられるフォスホケトラーゼ（PKT）を活用したグルコースからの高効率な L-グルタミン酸生産代謝経路の構築に成功した。また、非可食発酵原料のリグノセルロース系の有効利用をめざして、カウロバクター属菌にある Weimberg 代謝経路をこの菌株へ組み入れることで D-キシロースからの生産収率の向上も確認し、ともに代謝経路上で発生する CO_2 の削減という切り口も交え、環境保全と省エネの観点を入れた L-グルタミン酸の発酵生産系を確立してきた。更に、*C. glutamicum* は、その優れたタンパク質分泌特性を活かして、多くのタンパク質の効率的生産をも可能にしている。特に、目的のタンパク質の特性に応じて、Sec 系と Tat 系の二つの分泌系にて、分泌シグナル配列のファインチューニング等により高い生産量と純度での目的タンパク質生産に成功している。

我々は、この菌株の様々な育種検討のなかで、長鎖 RNA の生産についても効率的な生産系が構築できる可能性を新たに見出した。特定の塩基配列を有する RNA 分子はその応用として、核酸医薬への展開や環境調和型の新しいバイオ農薬（RNA 農薬）としても期待される一面をもつ高分子核酸である。RNA は非常に分解されやすい分子であるが、本菌株において目的 RNA の転写活性を高度に高めることで、従来は僅かにしか生産できなかった目的 RNA が高生産できることがわかった。本発表の後半では、そのような RNA の生産例に基づき、本菌株のもつ RNA 生産用 Cell-Factory としての潜在能力の一部を紹介したい。

Corynebacterium glutamicum, microbial cell-factory, RNA production

発表責任者：安枝寿（hisashi_yasueda@ajinomoto.com）

講演番号：4SY15-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:03～ A08 会場

日本における再生医療の産業化と製品開発

Development of regenerative medical products for new industrialization in Japan

○井家 益和（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)
○Masukazu Inoie (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.)

再生医療は根本治療を目指す革新技術であり、培養等により加工したヒト細胞・組織を用いて、人体の構造・機能を再建・修復すること目的とする。われわれはこれまでに自家培養表皮ジェイス®と自家培養軟骨ジャック®の 2 品目の再生医療製品を開発した。ジェイス®は広範囲の重症熱傷を対象とした表皮細胞シート、ジャック®は外傷性軟骨欠損等を対象としたコラーゲン包埋培養軟骨であり、それぞれ 2007 年と 2012 年に医療機器として薬事承認された。2013 年に制定された議員立法「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律」を基点として、薬事法が薬機法（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律）として改正され、再生医療若しくは遺伝子治療を目的とした細胞加工物を「再生医療等製品」とする新区分が、医薬品と医療機器とは別に設けられた。その際に、先の 2 品目は再生医療等製品に読み替えられ、2015 年には新たに自家骨格筋細胞ハートシート®および同種骨髄由来間葉系幹細胞テムセル®が承認されたものの、現在でも再生医療等製品は 4 品目に留まっている。

わが国で最初に再生医療を製品化するには、医薬品や医療機器とは異なった開発手法が必要であり、ヒト細胞から構成される移植用組織を工業製品として出荷するために、新たな品質管理の概念を構築した。患者自身の（自家）細胞を用いる場合は、ヒト組織の年齢、性別、部位や状態など様々な原材料から、一定の品質の製品を安定製造しなければならないため、数多くの細胞特性データを収集し、有効性と安全性を担保する品質規格を設定した。

有効性に関する規格としては、表皮細胞や軟骨細胞を目的細胞とした純度試験を行い、最終製品おける細胞含有量を規定した。また、限度試験として連続継代試験を行い、製造工程の培養期間の上限を設定した。安全性に関する規格では、原材料由来不純物として最終製品における目的細胞以外の細胞の残存量を評価するとともに、製造工程由来不純物として培地添加物の残留量を規定した。また製品の保存安定性試験を実施して、貯蔵条件と有効期間を、自家培養表皮で 10～25℃、56 時間、自家培養軟骨で 8～25℃、80 時間に設定した。

ジェイス®は 2016 年に巨大色素性母斑の切除創に対する適応拡大を行い、現在、ジャック®と合わせて年間数百例の受注がある。これまでに利益が確保できる再生医療の産業化を達成したものの、その市場は限定的である。さらなる再生医療の普及のため、眼科や免疫系の疾患領域の研究開発を行うとともに、大量生産を前提とした他人の（同種）細胞を用いた新たな製品開発を進めている。

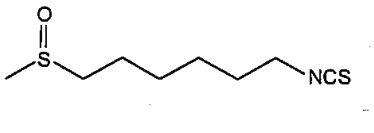
regenerative medicine, autologous cultured epidermis, autologous cultured cartilage

発表責任者：井家益和（masukazu_inoie@jpte.co.jp）

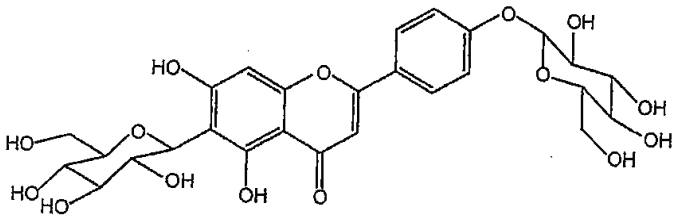
講演番号：4SY15-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:26～ A08 会場

本わさび機能性研究の最新知見
The latest functional study of Wasabi
○奥西 勲 (金印株式会社)
○Isao Okunishi (KINJIRUSHI CO., Ltd.)

本わさび（学名：*Wasabia japonica*）は日本原産の植物であり、その利用の歴史は古い。1300 年前の遺跡である奈良県明日香村の苑池から出土した木簡には「委佐俾三升（わさびさんしょう)」の文字が記されており、当地が薬草園であったことから飛鳥時代には薬草として利用されてきたことがうかがえる。さらに、日本最古の薬草辞典「本草和名（918 年)」にも「山葵（わさび)」の記載があり、本わさびを薬草として利用していたことが分かる。
現在では薬味としての利用が中心で日本食には欠かせないものとなっているが、その薬効についての認知はほとんどない。しかも、本わさびの辛さを手軽に利用できるように利便性の高さが追求されてきたため、本わさびの根茎部分をほとんど含まない加工わさび商品が中心となっており、ますます本わさびの貴重な薬効成分は利用されなくなっている。
我々は本わさびの薬効成分に着目し、長年研究を続けてきた。現在までに抗がん作用、抗酸化作用、抗炎症作用、美肌作用、抗アレルギー作用など、幅広い薬効があることが分かってきている。それらの有効成分として 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート（6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate; 6-MSITC）やイソサポナリン(Isosaponarin)、イソビテキシン(Isovitexin)などのフラボノイド類が同定されており、多くの効果効能を有することが確認されてきている。
今回は、それらの効果効能の中から、育毛効果、ダイエット効果、認知機能改善効果の最新の研究成果を中心に説明していく。



6-MSITC



Isosaponarin

Wasabi, Hair Care, Anti-aging

発表責任者：奥西　勲（i-okunishi@kinjirushi.co.jp）

講演番号：4SY15-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:49～ A08 会場

寒天事業における今後の展開について

The next prospect of agar business

○酒井 武彦（伊那食品工業株式会社　研究開発部）
○Takehiko Sakai (Ina food industry Co., Ltd. Reseach and Development)

伊那食品工業(株)は寒天に拘り、その研究開発に深耕してきた。寒天はガラクトースが直鎖状に結合した多糖類で、官能基や分子量などにより物性が変化する。これを制御することで、高強度、低強度、高粘弾性、又は高融点など、様々なタイプの寒天が開発された。その結果、物性の幅が拡がり従来に無い用途へ応用されるようになった。ところてん、みつ豆などに利用されていた寒天は、和菓子のみならず、洋菓子、総菜、飲料など様々な食品に利用されている。また、微生物や植物の培地を固化させる基材や、化粧品のマイクロゲル、特定保健用食品や機能性表示食品を取得した食物繊維としての健康機能、医薬品として認められている緩下作用など、ハイドロゲルとしての特性、機能性を活かした用途もなされている。本講演で寒天における今後の発展の可能性について紹介したい。

寒天と副資材を薄膜状に成型したフィルムを開発した。これは食品素材で出来ているため食べられるフィルムである。また、ヒートシールできるため包材として利用できる。近年、化成品フィルムの包材が廃棄物として問題視される中、このフィルムは生分解性であり、環境にやさしい循環型の素材として期待されている。

寒天を原料に製造されるオリゴ糖がアガロオリゴ糖である。寒天はガラクトースとアンヒドロガラクトースが交互に繰り返している多糖であり、アガロオリゴ糖は 2 糖、4 糖、6 糖、8 糖と 2 糖単位で構成される。一般的なオリゴ糖は整腸作用としての機能性報告がなされている中、アガロオリゴ糖は抗酸化作用や膝関節症改善作用を始めとした抗炎症作用などが報告されている。近年、腸内での作用が研究される中で、タイトジャンクションを構成するタンパク質の発現を向上させることが見いだされた。腸管リークによるアレルギー反応が問題とされる現代において一助足りえる素材の可能性が示唆された。また、運動機能の低下を抑える可能性も発見されている。このような機能をうまく取り入れることで、未病の食品素材に期待できる。

寒天はテングサ、オゴノリといった紅藻類から抽出される。このバイプロダクトである海藻残渣を発酵させることで、作物への肥料、植物活性剤又は土壌改良材としての利用を検討した。根菜としてはつか大根、葉菜として小松菜を検討したところ、発酵海藻残渣は根部の長さが伸長することが共通して検証された。これにより、多くの栄養を吸収できるようになることが示唆された。また耐病性が向上することも期待できる。減農薬が望まれる中、有望な素材として研究していきたい。廃棄からサステナブルな素材になることを期待したい。

Agar, Agaro oligosaccharide, hydro gel

発表責任者：酒井武彦（tsakai@kantenpp.co.jp）

講演番号：4SY15-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:12～ A08 会場

チンギスハンも食べていた?!Sea Buckthorn の機能
Function of Sea Buckthorn

○森 大輔、木村 雄輝、長野 稜太、後藤 智生（株式会社岐阜セラツク製造所）
○Daisuke Mori, Yuki Kimura, Ryouta Nagano, Tomoo Goto (Gifu Shellac MFG. Co., Ltd.)

株式会社岐阜セラツク製造所は、1947 年よりセラックの開発、及び製造、販売を行ってきた。その後、セラックのアルコール抽出、精製技術を応用して、植物からの有用成分抽出、精製などプロセス開発を得意とし、健康食品原料や化粧品原料などとして多数の製品を世に出してきた。また、自社開発素材として落花生渋皮のポリフェノール（2010 年及び 2012 年本大会にて発表）や Sea buckthorn(Hippophae rhamnoides)の開発を行っている。

Sea buckthorn はグミ科の落葉低木植物で寒冷地や砂丘の様な痩せた土地、塩分の多い海岸沿いなど厳しい環境でも生育できるため、中国、内モンゴル、ロシア、東欧など広い地域で自生している。枝には黄～橙色な直径 1 ㎝ほどの大きさの果実をびっしりとつける。果肉には、ビタミン C、フラボノイド、アミノ酸などの水溶性成分の他、不飽和脂肪酸やカロテノイドなど油溶成分も多く含有している。果肉重量の約 2%を占めるオイルには、パルミトレイン酸が高含有で存在しているのが特徴である。

近年、日本においても北海道で栽培され始めたが認知度は低い。チベットなどでは、Sea buckthorn の果実は医療目的で古くから食されてきた。四部医典タンカ（チベット医学の経典）にも記されており、胃や喉、肺などの不調に対して用いられていた。また、近年の科学的な研究により、心血管疾患リスクや炎症の低減の他、スキンケアとしての効能も報告されている。その他、眼科領域に関して、Sea buckthorn 実オイルの経口摂取によりドライアイが改善したという報告もある

我々は、日本における患者数が 2200 万人にも上ると言われているドライアイに対する効果に着目し、モデル動物を用いてより詳細な研究を行った。その結果、モデル動物の涙液量を正常値に改善する活性成分の特定や涙腺細胞の炎症を抑える効果が確認できた。本シンポジウムでは、Sea buckthorn にまつわる逸話や伝承的な使われ方などを交えながら、我々が行ったドライアイ改善に関る研究成果を紹介する。

sea buckthorn, dry eye, seaberry

発表責任者：森　大輔（gsm.rd@gifushellac.co.jp）

講演番号：4SY15-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ A08 会場

グアーガム分解物の生理機能とその応用

Physiological Functions and Applications of Partially Hydrolyzed Guar Gum (PHGG)

○安川 然太（太陽化学株式会社）
○Zenta YASUKAWA (TAIYO KAGAKU CO.,LTD.)

グアーガム分解物（製品名：サンファイバー®）は、インドの北部やパキスタンに生育する一年草の豆科植物であるグアー豆 （*Cyanopsis tetragonolopus*）がその原料である。グアー豆の胚乳部分のガム質を精製したものがグアーガムであり、増粘剤や安定剤として各種加工食品に用いられている。グアーガムはヒトの消化酵素で分解されない水溶性食物繊維であり、脂質・糖質代謝、便通改善、体脂肪減少などの種々の生理作用が1960年代より報告されてきた。しかし、水溶液にした時の粘度が極めて高く、これら生理作用を発現する量を食品に添加できず、その利用は限定されていた。

グアーガム分解物は、グアーガムの主成分の中性多糖類であるガラクトマンナンをβ-ガラクトマンナナーゼにより限定分解し低分子化することで低粘性化した水溶性食物繊維である。グアーガムの主要構成糖はマンノースとガラクトースからなるガラクトマンナンである。グアーガム分解物の基本構造は、D-マンノース（Man）がβ-1,4結合したマンナンが主鎖で、これに D-ガラクトース（Gal）が側鎖にα-1,6結合している。ManとGalの構成比は約2:1で、その平均分子量はグアーガムが200-300 kであるのに対し、グアーガム分解物は約20 kである。グアーガム分解物は、水溶性食物繊維として固形食品だけでなく、液状食品へも容易に配合できる。

グアーガム分解物は食物繊維として、腸内細菌を改善する作用があり、その作用を通して便秘の対象者に対しても、下痢の対象者に対しても効果を発揮する。例えば、便秘傾向のある女性に、1 日当たり 11g のグアーガム分解物を摂取させると、排便回数が増加した。また、乳幼児の非コレラ性の急性下痢、離乳期幼児での難治性慢性下痢、成人のコレラ性の下痢などの症状を緩和した。便秘にも下痢にも効果があることから、グアーガム分解物は過敏性腸症候群（IBS:Irritable Bowel Syndrome）にも効果を示すとされる。1 日当たり 5g のグアーガム分解物を IBS 患者に 12 週間摂取させると、小麦ふすま摂取群と比べて改善率が上昇した。

グアーガム分解物はメタボリックシンドローム対策としても用途が見込まれ、食事と共にグアーガム分解物を摂取すると、プラセボ群と比べ、食後血糖値を改善する効果が認められる。

2015年4月より、新たな食品の機能性表示制度として、「機能性表示食品」制度が開始された。これまでの研究をシステマティックレビュー（SR）することにより、グアーガム分解物を機能性関与成分とした「食後血糖上昇抑制」、「便通改善」、「一過性の下痢抑制」を表示した商品が受理されている。

Partially hydrolyzed guar gum, Dietary fiber, Sunfiber

講演番号：4SY15-6
講演日時、会場：3 月 18 日 10:58～ A08 会場

プレバイオティクス素材イヌリンの生理機能性と食品への応用

Physiological function of prebiotic inulin and application to food

○原 健二郎（フジ日本精糖（株））
○Kenjirou Hara (Fuji Nihon Seito Corp.)

イヌリンは自然界に幅広く分布しており、穀物、野菜、果物などに多く含まれ、われわれ人間は、古くからそれと知らずに食してきた食品成分のひとつである。イヌリンの分子構造は、スクロースのフルクトース残基にフルクトースがβ(2,1)結合で 1～60 分子、直鎖に結合したもので、難消化性の水溶性食物繊維である。その鎖長には広い分散性があり、鎖長の異なるものの集合体となっている。欧米では、チコリから工業生産されたものが日常の食材として流通しており、イヌリンについての研究例も多い。わが国では、酵素を利用して砂糖からイヌリンを製造する方法が開発されている。

イヌリンは、物性面、生理機能性面でそれぞれ特徴を持った素材である。物性面では、高濃度で水に溶解させると脂肪に似た食感を有する白色のゲルになる性質があり、食品中の油脂の代わりに用いることができ、脂肪代替素材としての用途がある。生理機能性面では、イヌリンはプレバイオティクス素材であることから、ヒトの消化酵素では分解されず、大腸内の腸内細菌、特にビフィズス菌に利用され、増殖を促進することから、腸内フローラのバランスを改善する効果が期待できる。このことから、便秘傾向者の排便習慣を改善するなどの整腸作用が明らかにされている。その他、ミネラル吸収促進効果、糖脂質代謝改善効果などが知られているが、これらの作用は腸内フローラ改善効果と密接に関連していることが考えられている。腸内フローラについては、近年、様々な疾病との関与が示唆されていることから、イヌリンとこれらの疾病との関わりを明らかにしていくことが今後の展望であり、課題でもある。

上記の通り、イヌリンには様々な生理作用があることから、国内外の臨床試験データが豊富に存在する。本講演では、イヌリンの腸内フローラへの作用を中心とした生理機能性について紹介し、2015 年度より始まった機能性表示食品制度への取り組み状況についても紹介したい。

Inulin, Gut microbiota, Prebiotics

発表責任者：原　健二郎（kenjirou-hara@fnsugar.co.jp）

講演番号：4SY15-7
講演日時、会場：3 月 18 日 11:21～ A08 会場

天野エンザイムの事業領域と研究開発
Business domains and R&D at Amano Enzyme Inc.

○山口 庄太郎（天野エンザイム）
○Shotaro Yamaguchi (Amano Enzyme Inc.)

天野エンザイムは、創業から 110 数年の歴史を有し、広く産業に貢献する酵素の製造販売に特化した会社である。会社設立時の医療用消化酵素の製造販売から始まり、その後食品用、診断用、医薬中間体合成用、ヘルスケア用酵素事業に乗り出してきた。大部分が微生物由来の酵素であり、液体培養及び固体培養の 2 種類の培養方法を行っている。自然と共生し資源を大切にする日本の文化・風土に育まれながら、World No.1 Speciality Enzyme Producer を目指し、現在では海外にも 4 ヵ所の営業販売拠点、3 ヶ所の製造拠点を有する。

本シンポジウムでは、天野エンザイムの概要と研究開発体制の紹介ののち、以下の 2 つの事業領域を概観する。各分野におけるトピックスも紹介する予定である。

【メディカル用酵素事業領域】
天野エンザイムの前身天野製薬は 1948 年に麦芽暫くして麹菌由来の消化酵素剤の製造販売会社として設立された。以来 70 年に渡って医療用及び OTC 用に消化酵素製剤を供給している。また関連のヘルスケア用酵素を Dietary supplement 用酵素として米国を中心に供給している。他に糖尿病患者の血糖定量用酵素を始めとした診断用酵素や医薬中間体製造等の合成(Biotransformation)用酵素なども提供している。最近では、酵素市場の新しい分野として再生医療分野でのニーズに応えるため、細胞分散用酵素や顕微授精用酵素について、アニマルフリー、低エンドトキシン、GMP 準拠、更にクラス 100(グレード A)の無菌度を実現した「無菌酵素」の供給を開始した。
【産業(主として食品)用酵素事業領域】
1970 年代、澱粉からブドウ糖を製造するグルコアミラーゼの製造から食品加工用酵素の供給を開始した。以後、糖質加工の他、蛋白加工、油脂加工、調味料、フレーバー、醸造分野を中心に多種多様な酵素を提供している。食品に高付加価値を与える Speciality 酵素の開発には特に注力している。近年では健康志向、安全・安心志向の高まりを受けて「ナチュラル」、「オーガニック」、「アレルゲンフリー」、「non-GMO」等のキーワードで表される多様なニーズ、また宗教的戒律に則った Kosher、Halal のニーズも世界中で拡がっている。天野エンザイムでは、これらのニーズに応えるため伝統と最新技術(蛋白質工学等)の融合により真に顧客に求められる酵素の提供を目指している。

Industrial enzyme, Digestive enzyme, Food processing enzyme

発表責任者：山口庄太郎（shotaro_yamaguchi@amano-enzyme.com）

講演番号：4SY16-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A09 会場

学術分野特に農学分野における海外遺伝資源に関わる名古屋議定書の対応について

Nagoya Protocol Implementation in Academia including Agriculture Fields

○鈴木 睦昭（国立遺伝学研究所）
○Mutsuaki SUZUKI (National Institute of Genetics)

研究に利用される植物、動物、微生物を遺伝資源と呼び、1993 年に発効された生物多様性条約において、入手には事前の同意および提供者との合意事項を含む契約を交わすことが、掲げられている。

海外からの遺伝資源へのアクセスと利益配分（ABS)）についての国際的な取決めである名古屋議定書について、我が国は本年８月 20 日に締約国となった。長年に渡る丁寧な検討を経て、国内措置である ABS 指針については、簡易であり、範囲が明確、訴求もないと行った形となり、ひとまず、国内措置の開始に伴い、急激な変化というものはないものとなった。遺伝資源の取得時に提供国法令の遵守については、今まで通り行わなければいけない。また、我が国が締約国となったことで、提供国からの意識は高いものとなる。そのため、共同研究契約書の締結を基本とした各大学の実態にあった体制構築が必要となっている。さらに、多くの提供国で、ABS に関係する法令が整備されてきている。例えば、ベトナムにおいては、2017 年７月からガイドラインが開始されており、韓国においては、2018 年８月より新規法令が開始する。そこで、これらへの対応が急務となる。

本講演では、我が国の国内措置(ABS 指針)を説明し、また、提供国の法令やシステムをご紹介する。その中で、どのような具体的な対応が必要か、また、研究者がやるべきことは何かについてご説明するとともに我々の対応事例をご紹介する。

さらに、DNA 塩基配列に代表されるデジタル配列情報について、2016 年 12 月にカンクーンで開催された COP13 において、独立した決定事項として、二年間かけての検討が始まっている。すでに、各国の意見提出がなされ、ブラジル、アフリカ、インドといったところから、条約の対象とし、利益配分のシステム構築を進めるべきである意見が表明されている。

また、生物多様性条約事務局からの調査報告書案が提出された。議論の主な焦点は、１）デジタル配列情報が生物多様性条約および名古屋議定書の対象となるか？２）トレーサビリティーの持つシステムの提案に対する対応、ということとなるだろう。しかしながら、それについては、研究の停滞を引き起こすシステム構築や新しい規制を作ろうという動きに関して、我が国及び国内外の研究者は、規制等について反対の表明を示すべきである。デジタル配列情報の議論の最新情報をご提示する。

nagoya protocol, digital sequence information, ABS

発表責任者：鈴木睦昭（msuzuki@nig.ac.jp）

講演番号：4SY16-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ A09 会場

産業界から見た遺伝資源へのアクセスの円滑化と名古屋議定書への対応

Smooth Implementation of Access and Benefit-sharing (ABS) and the Nagoya Protocol - A Perspective from Japan's Industry

○井上 歩（（一財）バイオインダストリー協会)
○Ayumu INOUE (Japan Bioindustry Association)

1993 年 12 月に生物多様性条約（CBD）が発効し,「遺伝資源へのアクセスと利益配分」(Access and Benefit-sharing : ABS）の基本ルールが示された。また，2014 年 10 月には，この ABS を円滑に進めるための国際的な枠組みを定める名古屋議定書が発効した。

この CBD や名古屋議定書の下での ABS の基本ルールというのは, ①遺伝資源を取得するにあたっては，遺伝資源提供国の国内法令等に従い，相手の国の許可を得ること，②遺伝資源の利用から生ずる利益は，契約に従って公正かつ衡平に配分するということである。また，CBD 及び名古屋議定書の下で,「遺伝資源」は「現実の又は潜在的な価値を有する生物素材」，その「生物素材」は「遺伝の機能的な単位を有する植物，動物，微生物その他に由来する素材」と定義されており,「遺伝の機能的な単位」というのは「遺伝子」のことであることから，農芸化学領域の研究対象となる，生物由来のほぼ全てのサンプルが，ABS の対象となり得ることになる。

また，これらの国際的な動きに対して日本は，1993 年 12 月に CBD の締約国に，昨年（2017 年）の 8 月には名古屋議定書の締約国となり，名古屋議定書の締約国となると同時に，その国内担保措置として ABS 指針が施行された。このため，日本の農芸化学領域の研究者も，ABS に無関心ではいられない状況となっている。

（一財）バイオインダストリー協会（JBA）では，CBD 発効当初からこの ABS に関し，日本の企業や大学等の研究者が適切に対応し，遺伝資源を用いた研究開発が円滑に進むよう，様々な支援活動を行ってきた。

本シンポジウムでは, CBD/ABS の基本や名古屋議定書及び ABS 指針の概要を紹介するとともに, JBA の ABS 支援活動を紹介する。

また，遺伝資源を用いた研究開発を行う際に遭遇するかもしれないリスクのひとつとして,「ABS に関するルールを遵守していない！」として糾弾される恐れがある。このような糾弾のことを「バイオパイラシー」(Biopiracy) と呼ぶことがあるが, バイオパイラシーとして糾弾された事例を示して、そうならないためにはどのような点に注意すべきか紹介したい。

さらに, 昨年 ABS 指針が施行されたことを受け, これまでに JBA が行ってきた関連活動の中から, ①企業や大学等の研究者が ABS 指針へ対応するにあたっての留意点や対応スキームのとりまとめ, ②ABS に関する契約のひな形の事例収集等の取り組みを紹介する。

Access and Benefit-sharing (ABS), genetic resources, Nagoya Protocol

発表責任者：井上 歩（inoueayum@jba.or.jp）

講演番号：4SY16-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ A09 会場

微生物資源を利用する国際共同研究の実施事例

International cooperative study conducted in Convention on Biological Diversity era

○鈴木 健一朗（東京農大応生科醸造）
○Ken-ichiro Suzuki (Tokyo Univ Agriculture)

微生物の多様性は微生物分類学だけでなく、機能の多様性や分布の面から応用微生物学的視点からも興味深い研究課題のひとつである。そのため、日本にはない自然環境からの微生物の分離や新しい機能の探索は国際共同研究の課題として広く行われてきた。この課題は相手国にとっても、自国の微生物資源の多様性や潜在能力を示す機会として期待されている。しかし、近年は生物多様性条約によって生物遺伝資源に対する提供国の主権的権利が認められたことにより、海外での自然環境からの生物遺伝資源の取得や、原産国からの移転に対し、その国の関連法規制を遵守しなければならない。そのため、最近では海外の生物遺伝資源を研究材料に使用することを躊躇する傾向にある。

私が代表で提案した地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS)のインドネシア科学院（LIPI）との共同プロジェクト「生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センターの構築」は 2010 年に採択され、2016 年 4 月に完了した。これは海外での微生物材料の探索、研究、日本への移転と研究を含み、インドネシアの微生物資源の利用基盤を整備する事業であった。海外の研究者と共同研究をするときの注意点の参考として、そのときの経験を紹介する。

(1) 共同研究の実施にあたり、まず相手側研究者と研究計画を具体化するとともに、材料移転の可否と方法、実施場所、成果の発表方法を協議し、相手国で承認を得られる内容にまとめ、機関間で合意した上で、相手国の当局の承認を得る。
(2) 材料の帰属は原産国とすることを認めても、論文を共著で発表することで、得られた知財権を共有し、その後の発展的研究の自由度を残す。これからは共同研究で得られた塩基配列情報も論文に成果として含めておいた方がよいと考えられる。
(3) 利用する生物資源（微生物株）は、原産国の微生物保存機関に相手側研究者から寄託し、合意した条件での分譲を可能としておく。そこから日本の機関に寄託できるとさらによい。

実際、名古屋議定書に対応した明確な国内法が整備された国は少ない。また、相手側の研究者が自国の法規制について十分な知識を持たない場合が多い。したがって、機関間での協定の締結、論文発表や微生物株の寄託により、透明性のある形で成果を担保しておくことは将来の法規制の変化に対応するためにも重要である。何よりも重要なのは相手側研究者の研究に対する意欲と共著の論文の成果を喜び合える信頼関係である。＊本事業は SATREPS プロジェクトとして（独）製品評価技術基盤機構、東大、理研、インドネシア LIPI と共同で実施されたもので、関係者の協力、支援に感謝します。

Convention on Biological Diversity, microbial resources, SATREPS

発表責任者：鈴木健一朗（ks206184@nodai.ac.jp）

講演番号：4SY16-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ A09 会場

植物遺伝資源利用は，二つの世界に分かたれている
Utilization of Plant Genetic Resources is divided into two different worlds

○山本 昭夫（農研機構遺伝資源セ）
○Akio Yamamoto (Genetic Resources Center, NARO)

植物分野の遺伝資源には，「食料及び農業のための植物遺伝資源に関する国際条約」（ITPGR）が適用される場合と名古屋議定書を含む「生物多様性条約ファミリー」（CBD ファミリー）が適用される場合がある．このため他分野における遺伝資源の ABS を考えるより，一層多くの知識が必要である．

ITPGR は，食料及び農業のための作物育種を念頭におき，多数の遺伝資源を多数の国から導入して交雑・選抜し優良形質を集積して行う品種開発が，CBD ファミリーの時代においても円滑に行えるよう設計されたものである．そこにおいては，世界共通の ABS ルールが予め定められており，それに従うだけで ABS が実現できる（個別交渉不要）．つまり，ABS を二国間でそれぞれ異なる条件で行うのではなく，多数国間で共同的に行っている（マルチラテラルシステム）．また，遺伝資源中の優良形質は育種の成果物（新品種）に組み込まれ，さらに次の新品種を生み出す遺伝資源として利用されていく．

他方，本学会会員諸氏による研究開発での植物遺伝資源利用は，こうした育種利用と異なる性格が強いのではないかと推測する．すなわち，植物成分の研究や農薬開発のための植物利用，あるいは植物の持つ栄養についての研究のように，利用遺伝資源が研究開発の成果物に組み込まれていくのでなく，研究開発の成果物には，もはや遺伝資源でない有用物質等として価値が見いだされていく側面が強いように思われる．そしてこのような遺伝資源利用においては，基本的に CBD ファミリーが適用されるものと思われ，そこには CBD の根底にある二国間主義により，個別の ABS 交渉が必要となる．

本講演では，このように大別できる植物遺伝資源の ABS の全体像を概観する．

plant genetic resources, ITPGR, CBD family

発表責任者：三輪清志（kiyoshi_miwa@ajinomoto.com）

講演番号：4SY16-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ A09 会場

合成生物学を巡る国際議論の行方とその課題

A current international discussions over synthetic biology and its future.

○白江 英之（一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム）
○HIDEYUKI SHIRAE (Japan Biological Informatics Consortium)

21 世紀初頭に紹介された合成生物学という学問は、その学問の持つポテンシャルの高さから、様々な科学技術の応用に展開されている。例えば、農業分野では生産性の高い種子の改良や自然界の複雑な化合物（マラリア治療薬のアルテミシニンなど）のバイオ技術による工業化や藻類を用いたバイオ燃料生産への応用などが挙げられる。一方、合成生物学の発展に伴い、社会一般ではあまりなじみのないこの名前に対し得体のしれない脅威を抱く人、同学問が遺伝子を操作して新たな性質をもった生物体を構築することに宗教的な倫理観から嫌悪を抱く人、あるいはこれまで自然界にある作物やその抽出物（フレーバー、フレグナンスなど）で生計を立ててきた人々が、合成生物学の登場で自ら生活が脅かされるのではないかと危惧を感じる人などがいることを忘れてはならない。

1992 年 5 月 22 日に発効した生物の多様性に関する条約（以下、「CBD」と略す。）は、多国間の環境協定で、現在世界 195 の国と欧州連合が加盟している。現在この CBD の 2 年ごとに開催されている締約国会議である COP にて、合成生物学の発展をよく思わない国々とイノベーションを守りたい先進国との間で激しい議論が繰り広げられている。具体的には、本条約の３つの目的を根拠に一部の途上国および環境保護団体が団結して、合成生物学という学問領域が生物多様性に影響を与えるとして、合成生物学から生じる生物、生産物、構成成分（以下「３要素」と略す。）に対する規制の強化とその３要素から得られた利益の配分を求める活動が活発化している。その活動は、CBD の COP の中だけに留まらず、世界の環境保護団体が団結して直接合成生物学を実施しているベンチャー企業やその取引先の企業に対し、WEB 上に公開質問状を掲載し、さらにその企業の不買運動を展開するなどの行動に出ている。また最近では、ゲノム情報に基づくデジタル遺伝子配列情報に関しても、名古屋議定書の遺伝資源の一部として認定させて、その情報を電子媒体として取得する際の手続きの厳格化や、その情報の活用によって作製された３要素から生じる利益の配分を約束する契約書の締結を求める動きも出てきている。

この講演では、2016 年 12 月にメキシコのカンクーンで開催された COP13 での議論と、それに続く各国の代表者が参加した合成生物学に関するオンラインフォーラムの様子、さらには 2017 年 11 月にカナダのモントリオールで開催された各国代表者による専門家会議での議論の様子を紹介し、今 CBD でどのような議論が展開されているのか講演する予定である。

Synthetic biology, The Convention on Biological Diversity, Nagoya Protocol

発表責任者：三輪清志（kiyoshi_miwa@ajinomoto.com）

講演番号：4SY17-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:10～ A10 会場

次世代バイオ医薬：完全デノボ設計分子ライブラリーによる分子標的ペプチドの創出
A new generation of biologics: Generation of molecular-targeting peptides by directed evolution of de novo designed peptide libraries
○藤井 郁雄（大阪府立大理）
○Ikuo Fujii (Osaka Prefecture Univ.)

近年、分子標的医薬として抗体医薬が注目されているが、その限界も明らかにされてきている。抗体医薬には，以下のような問題点が指摘されている。１）ヒト化等が必要である。２）細胞内のタンパク質をターゲットとすることができない。３）生産に膨大なコストを必要とする。さらに，４）特許の制限が複雑に絡み合っている。これらの問題点は，抗体の基本構造に起因するものである。そこで，当研究室では，イムノグロブリン構造（IgG）を利用せず、目的の標的タンパク質に対して特異的に結合する抗体様物質の研究をスタートした。われわれは，抗体様物質として，強固な立体構造（ヘリックス・ループ・ヘリックス）をもつペプチドを考案し，ファージ表層提示法を組み合わすことにより独自の立体構造規制ペプチド・ライブラリーを開発した。これを疾患関連タンパク質に対してスクリーニングし，高い結合活性（*K*d 値：数 nM）をもつペプチドを獲得することに成功した。得られたペプチドは，強固な立体構造をもつため，酵素分解に対し抵抗性を示し，血清中においても安定であった（半減期：15 日）。さらに，非抗原性であること，細胞膜透過性を持つことを確認した。そこで，このような中分子量（分子量：3000～5000）の分子標的ペプチドを「マイクロ抗体」と名付けた。本講演会では，各種疾患関連タンパク質に対する「マイクロ抗体」の獲得とその生物活性について紹介するとともに，中分子医薬品としての可能性について討論する。

peptides, phage-displayed libraries, directed evolution

発表責任者：藤井　郁雄（fujii@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4SY17-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A10 会場

人工蛋白質ナノブロックによる多様な自己組織化超分子ナノ構造複合体の創出： ネオバイオ超分子の創生を目指して

Self-Assembling Supramolecular Nanostructure Complexes Created from *de Novo* Protein Nanobuilding Blocks (PN-Blocks) toward NEO-Bio-Supramolecules

○新井 亮一[1,2] ([1]信州大繊維、[2]信州大菌類微生物セ)
○Ryoichi ARAI[1,2] ([1]FTST, Shinshu Univ., [2]CFMD, Shinshu Univ.)

新たなバイオ分子として、人工蛋白質や蛋白質複合体をデザインし、ナノスケールの形や大きさを合理的に創り出す技術の開発は、ナノバイオテクノロジーへの応用展開等、今後ますます重要になってくると考えられる。近年我々は、バイナリーパターン法により創出された新規人工蛋白質(*de novo* protein) WA20 が、分子間フォールディング（ドメインスワップ）4 本ヘリックス 2 量体構造を形成することを解明し (PDB: 3VJF)、この特徴的構造を活かして、蛋白質ナノブロック(Protein Nanobuilding Blocks: PN-Block)を設計開発してきた。特に対称性構造の基本ブロックを幾何学的に組み合わせることで、多様な超分子ナノ構造複合体の創出を試みてきた。まず、第一弾として、WA20 と T4 ファージの 3 量体 foldon ドメインと融合した蛋白質ナノブロック(PN-Block)として、WA20-foldon を設計開発し、6，12，18，24 量体…（6 の倍数量体）の超分子複合体の創出に成功した(Kobayashi N et al. *JACS*, 2015)。次に、第二弾として、WA20 を 2 個直列につないだ PN-Block を構築し、自己組織化により環鎖状構造を構築した。また、WA20 と混合して変性リフォールディングをすることにより、2 種類の PN-Blocks をヘテロ再構成することに成功し、環鎖状から直鎖状構造の複合体へのフォーム変換を可能とした。さらに、この複合体を金属イオンによって自己集合させることにより超分子ナノ構造を構築し、原子間力顕微鏡等により観察した。

さらに、最近、ナノマテリアル等への応用を見据えて、ナノブロックを構成する人工蛋白質の構造安定化を目的として、立体構造を基にして、アミノ酸変異を導入した改変新規人工蛋白質 SUWA (Super WA20)を開発した。熱変性実験の結果、SUWA の変性温度 T_m は 122℃と極めて高く、WA20 よりも 47℃もの熱安定性の向上に成功した。そこで、SUWA の安定化機構の理解をさらに深めるために X 線結晶構造解析を行って立体構造を解明したところ、WA20 と同様に特徴的な分子間フォールディング 4 本ヘリックスバンドル二量体構造を形成していた。変異導入箇所を詳細に観察すると、新たな疎水性相互作用が形成されており熱安定化への寄与が確認された。蛋白質ナノブロック SUWA-foldon を構築したところ、6 量体や 12 量体等の複数の自己組織化超分子ナノ構造複合体の形成が示された。また、熱変性実験を行ったところ、これらの蛋白質ナノブロック複合体においても安定性の向上が見られ、さらに部分的熱変性・再構成による動的秩序構造の形成も示唆された。今後も、新たな PN-Block の設計開発及び組み合わせによる超分子ナノ構造複合体の創製により、天然分子を超えた“ネオバイオ超分子”の創生を目指す。

Artificial protein design, Protein nanobuilding block (PN-Block), Supramolecular NEO-Biomolecules

発表責任者：新井 亮一（rarai@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4SY17-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:50～ A10 会場

再構成型セルフリータンパク質合成系を用いたタンパク質配列空間と成分濃度空間探索

Exploring the sequence space and the concentration space using reconstituted in vitro transcription-translation system.

○松浦 友亮 (阪大工生命先端)
○Tomoaki Matsuura (Dept Biotechonol, Osaka Univ.)

細胞を構成する分子の多くが明らかになってきた現在、in vitro で生体分子を組み合わせることで生命システムを再構成する試みがある。この構成的アプローチを用いて、何が明らかになる、もしくは達成できるだろうか。我々は、東京大学の上田らのグループにより開発された再構成型セルフリータンパク質合成系 PURE system をベースとした構成的アプローチ研究を進めてきた。本講演では、2 つのトピックスを紹介する。

一つ目は、再構成型セルフリータンパク質合成系（in vitro transcription translation system (IVTT)）を人工脂質二重膜に内包させた人工細胞システムを用いた膜タンパク質の配列空間探索である。リポソームディスプレイ法と名付けたこの手法は、細胞サイズのリポソーム内で IVTT を用いて 1 分子の DNA を鋳型として膜タンパク質を合成する技術に基づいている。本手法により、我々は pore 形成膜タンパク質であるαヘモリシンの機能を野生型よりも約 30 倍向上した変異体を獲得することに成功した。その他、複数の膜タンパク質の機能進化にも成功している。

二つ目は、再構成型 IVTT を用いた濃度空間探索である。再構成型 IVTT は高度に精製された 69 成分から構成され、これら 69 成分の濃度によりタンパク質合成活性が決まる。再構成型 IVTT のタンパク質合成活性の最適化は、69 次元の濃度空間の適応度地形の山登りに対応する。仮にある成分の濃度変化 x と y がタンパク質合成活性に与える効果が Δf_x, Δf_y だとする。二つの濃度変化を同時に導入したときの効果 $\Delta f_{(x+y)} = \Delta f_x + \Delta f_y + \Delta f_{xy}$ と書ける。$\Delta f_{xy} \neq 0$ のとき、濃度変化同士が epistatic であるという。我々は、再構成型 IVTT の成分濃度をシステマティックに変化させる事で、タンパク質合成活性を 49 倍向上させる事に成功した。また、その過程で適応度地形の episitasis に関する情報を得る事に成功した。これらの結果を紹介する。

Cell free protein synthesis, bottom-up approach, Directed evoltuion

発表責任者：松浦友亮（matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4SY17-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:10～ A10 会場

マイクロドロップレットを用いた高速スクリーニングによるネオバイオ分子創生

Generating NEO-Biomolecules by high throughput screening of microdroplets

○松村 茂祥（富山大・院理工）
○Shigeyoshi Matsumura (Univ. of Toyama)

ガラス等の基板上に微細な流路を作製し、その中に液体を流して化学反応を行う分野が近年発展しており、μTAS や Lab on a Chip と呼ばれている。この分野ではこれまで、リアクター内に連続相の液体を流す研究が主流であった。しかし最近の技術発達により、流路内に不連続相を作り出すことが可能になり、注目を集めている。この不連続相とは具体的には、水溶液がオイルに分散した油中水エマルジョン（W/O emulsion）液滴のことである。個々の液滴は微小なマイクロリアクターと見なすことができるため、極めて多種類の化学反応を独立かつ平行に行うことが可能である。すなわち、化学反応のハイスループットな解析に応用できると期待されている。このような、マイクロ流路を用いてエマルジョン液滴を高度に操作する技術体系は、ドロップレット・マイクロフルイディクス（Droplet microfluidics）と呼ばれている。

このドロップレットの内部は水溶液であるため、水溶液中での反応、すなわちライフサイエンスとの相性がよい。液滴の内部には、水溶性の物質はもちろんのこと、水溶液中で分散可能な固形物（細胞やビーズ）など、多様なものを封入できる。すなわち、DNA やタンパク質のような生体高分子、遺伝子や細胞の高速解析・スクリーニングが可能となる。そこで我々は、生物のダーウィン進化を模倣することで生体高分子を試験管内で進化させる「進化分子工学」にこの技術を応用し、本研究分野を大きく拡張・発展させることを目指して、研究を行っている。本講演では、まずドロップレット・マイクロフルイディクスについて概説し、次いでその応用例として、我々が取り組んでいる機能性 RNA の人工進化研究を紹介したい。

droplet microfluidics, directed evolution, RNA engineering

発表責任者：松村 茂祥（smatsumu@sci.u-toyama.ac.jp）

講演番号：4SY17-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A10 会場

新規機能性分子スクリーニングを指向した DNA 結合タグによる標的タンパク質の精密空間配置

Spatial arrangement of target proteins using DNA binding tags for the functional screening of "NEO-Biomolecules"

○兒島 孝明、中野 秀雄（名大院・生命農・生命技術）
○Takaaki Kojima, Hideo Nakano (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

我々は、機能性生体分子の *in vitro* ハイスループットスクリーニング技術、ビーズディスプレイ法を開発し、この技術を駆使して様々な種類のスクリーニング系を構築してきた。この手法は、W/O エマルジョンの水相中で 1 分子 PCR を行い、DNA ライブラリーをマイクロビーズ上にクローン化するエマルジョン PCR 法とこの”ビーズライブラリー”を鋳型として DNA（遺伝子型）と転写翻訳されたタンパク質（表現型）を *in vitro* で対応付けする W/O エマルジョン内無細胞タンパク質合成系から構成される（1, 2)。本手法は、膨大な数の分子ライブラリーを生細胞を用いることなく作製することが可能であり、目的の性質を持つ”ネオバイオタンパク質”をコードする遺伝子を、セルソーターによって 10^8/h 程度のスループットで取得できる。

ファージ由来 DNA 結合タンパク質である Cro 二量体を単鎖化した single chain Cro (scCro) は、ビーズディスプレイ法における遺伝子型と表現型を対応付ける分子ツールであり、この scCro とその結合 DNA を介して種々のタンパク質をマイクロビーズ上に安定に提示することができる (3)。我々はこの scCro タグを用いてビーズディスプレイ法による西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）の *in vitro* ハイスループットスクリーニング系の構築に成功した（4)。

さらに我々は、この scCro とその変異体（scCroM）及びこれらの各結合配列を用いて DNA 上で 2 つの異なるタンパク質を空間的に配置し、BioLayer Interferometry（BLI 法）を用いた評価により scCro および scCroM が、適切な条件下で特異的認識配列それぞれに直交的に結合することを確認した。また、これらの DNA 結合タグを駆使し、トランスグルタミナーゼおよびその基質の分子レベルでの空間的配置に基づく酵素アッセイシステムを構築した。これらの結果は、scCro タグが DNA リガンド上のタンパク質の合成空間配置を容易にする強力なツールであることを示唆している。

上記の成果に加え、この scCro タグを用いたネオバイオ分子創出に向けた今後の展開についても述べたい。

(1) Kojima et al. *Nucleic Acids Res.*, 33, e150 (2005)
(2) Gan et al. *Biotechnol. Prog.*, 24 1107-1114 (2008)
(3) Kojima et al. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 147-153 (2016)
(4) Zhu et al. *PLoS One*, 10, e0127479 (2015)

DNA binding protein, Bead display, BioLayer Interferometry (BLI)

発表責任者：兒島孝明（kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY17-6
講演日時、会場：3 月 18 日 10:50～ A10 会場

ドメインライブラリー的発想によるタンパク質のキメラ設計：T-cell recruiting 抗体を例に
Domain library approach to the chimera design of T-cell recruiting antibody

○梅津 光央（東北大院工）
○Mitsuo Umetsu (Tohoku Univ.)

タンパク質は、新しいタンパク質の機能や構造が年間 1 万件程度報告されており、他の有機・無機材料と比較すると構造安定性は劣るものの、機能の多様性と特異性の面では他素材を凌駕したライブラリーを持つ分子である。我々は、タンパク質が階層的構造であり、機能を発現させる主な構造単位がドメイン(モジュール)であることに着目し、ドメインを「単位」とした機能ドメイン群からライブラリー的発想と積木細工的にタンパク質を設計する手法を組み合わせることで新たな機能素子を創り上げる研究を行っている。本発表では、腫瘍がんを標的としたがん治療抗体を出口として、ライブラリー的発想によってキメラなタンパク質を迅速に設計するプロセスを紹介する。

一般的ながん治療抗体は、自然免疫系の NK 細胞の細胞傷害作用を利用するが、次世代抗体として獲得免疫系を利用すべく T リンパ球とがん細胞を架橋する二重特異な T-cell recruiting 抗体の開発がおこなれている。この T-cell recruiting 抗体の腫瘍傷害性は、構成される抗体の特性(標的, エピトープ)やドメインの組み合わせ構造によって大きく変化するが、その規則は分かっていない。そこで我々は、既存の抗体群から T-リンパ球上の活性化シグナル伝達蛋白質に特異的な抗体と上皮増殖因子受容体(EGFR)群を選抜し、それらの可変領域断片を構成要素として設計される 100 種を超える二重特異性抗体群を迅速に調製・薬効評価を行うスクリーニング系を開発することで、高活性な二重特異性抗体を同定すると共に高活性ルールが抽出できることを示してきた。そして、そこから抽出したルールより、新しい構造フォーマットをもつ二重二価な抗体を骨格とした T-cell recruiting 抗体も提案している。本発表では、この新規構造フォーマットと迅速薬効スクリーニングによる高薬効な T-cell recruiting 抗体開発の可能性を紹介する。

antibody, T-cell, protein engineering

発表責任者：梅津 光央（mitsuo@tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY17-7
講演日時、会場：3 月 18 日 11:10～ A10 会場

創薬を指向した T7 ファージウィルス上でのネオバイオ分子の創成

Creating NEO-Biomolecules on T7-Bacteriophage for Drug Discovery Aims

○瀧 真清（電通大院情報理工）
○Masumi Taki (UEC)

近年、進化分子工学的手法を用いて、治療／診断等の医療応用が可能な有用分子を創成する研究が盛んになっている。我々は、T7 ファージ上に提示させたランダム化させたライブラリーペプチドに人工分子を結合させ分子進化させる手法（gp10 based-thioetherification; 10BASE$_d$-T）を開発し、人工分子の機能とペプチドの分子標的能とを併せ持たせたネオバイオ分子の取得を行ってきた[1]。このとき人工分子には、標的結合に関わり、なおかつ環境応答性蛍光を示すなどの人工機能を併せ持つよう分子設計しておく。これにより、人工機能を生かしつつ高い標的特異性を新たに付与させた分子を選択することが可能となる。

具体例として、環境応答性の蛍光分子（Prodan や DMN など）を人工分子として用い、その周辺ペプチド構造を分子進化により最適化することで、標的蛋白質(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ; GST)に結合したときだけ蛍光色が黄色から青色に変わりつつ蛍光強度が顕著に増大するセンサー型のネオバイオ分子の取得に成功した[2]。

現在基礎学術面において、分子進化の途中段階にて次世代シークエンス解析（Next Generation Sequencing: NGS）を行うことで、ネオバイオ分子の構築過程を追跡している。応用面では、血液中の特定蛋白質を標的として、これらを即時検出する蛍光診断薬の探索を行っている。

[1] (a) K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito, M. Minami, M. Taki, *Chem. Commun.*, **50**, 3921 (2014), inside cover article; (b) Y. Tokunaga, Y. Azetsu, K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito and M. Taki, *Molecules*, **19**, 2481 (2014); (c) K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito and M. Taki, *Mol. BioSyst.*, **9**, 2988 (2013).

[2] (a) M. Taki, H. Inoue, K. Mochizuki, J. Yang, Y. Ito, *Anal. Chem.*, **88**, 1096 (2016); (b) S. Uematsu, T. Midorikawa, Y. Ito, M. Taki, *AIP Conf. Ser.*, **1807**, 020028 (2017); (c) 瀧 真清, 伊東 祐二, *生物工学会誌*, **94**, 473 (2016).

phage display, solvatochromic fluorophore, artificial-molecule evolution

発表責任者：瀧　真清（taki@pc.uec.ac.jp）

講演番号：4SY17-8
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ A10 会場

高集積マイクロウェルアレイシステムによるネオバイオ分子創出

High Density Microwell Array System for Creating NEO-Biomolecules

○上野 真吾[1,2]、一木 隆範[1,2] ([1]ナノ医療イノベーションセンター、[2]東大工)
○Shingo Ueno[1,2], Takanori Ichiki[1,2] ([1]Innovation Center of NanoMedicine, [2]The Univ. Tokyo)

現在、無細胞タンパク質合成系を利用して、10^{12}種以上の多様性を持つ抗体やペプチドライブラリーから高親和性分子をスクリーニングする技術が進展し、実用の域に達している。菌体等の生育条件に依存しない無細胞タンパク質合成系の利用は、産業用酵素等のスクリーニングにおいても有用であると考えられる。酵素スクリーニングでは、遺伝子型分子である DNA もしくは RNA と表現型分子である酵素の対応付けを行い、尚且つ変異体毎に触媒反応を行う空間を用意する必要がある。この条件を満たす実験系の構築が、無細胞タンパク質合成系を用いた酵素スクリーニングにおいて解決すべき主要な課題となっている。本課題への回答として、我々は高集積マイクロウェルアレイの利用を提案している。

直径および深さが 4 μm のマイクロウェルを 1cm 角あたり 100 万個集積させたチップを用意し、そのマイクロウェルを、遺伝子型分子と表現型分子の対応付け、および触媒反応を行う空間として利用する。BEAMing 法によって調製した DNA 固定化磁気ビーズを磁場走査によってマイクロウェルにランダム配置することで、高集積 DNA マイクロウェルアレイを作製する。続いて、個々のマイクロウェル中で DNA から酵素を無細胞合成し、高集積酵素マイクロウェルアレイを形成する。この際、マイクロウェル中には DNA と無細胞合成された酵素が共配置され、遺伝子型分子と表現型分子の対応付けが為されている。次に、無細胞合成された酵素の触媒反応をマイクロウェル中で行い、1 cm 角あたり 100 万種程度集積された酵素変異体の活性をマイクロアレイのフォーマットでスクリーニングする。最後に、高活性酵素変異体が配置されているマイクロウェルから、その酵素変異体の配列情報がコードされている DNA 固定化磁気ビーズを回収し、回収した DNA を元に次世代の変異体ライブラリーを調製することで、酵素の分子進化サイクルを回す。

本技術は、従来マイクロタイタープレートを用いて行われていた酵素反応スクリーニングを、高集積微小容量マイクロウェルアレイで行うことにより、スクリーニングに要する時間とコストを削減し、従来では不可能だった数百万種以上の変異体からなる酵素ライブラリーのスクリーニングを可能にする。本報告では、ネオバイオ分子創出を目的とした高集積マイクロウェルアレイシステムの開発状況について紹介する。

Directed evolution, Microarray, High throughput screening

発表責任者：上野真吾（ueno-s@kawasaki-net.ne.jp）

講演番号：4SY18-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A11 会場

シングル B 細胞由来モノクローナル抗体の迅速取得と大腸菌による生産

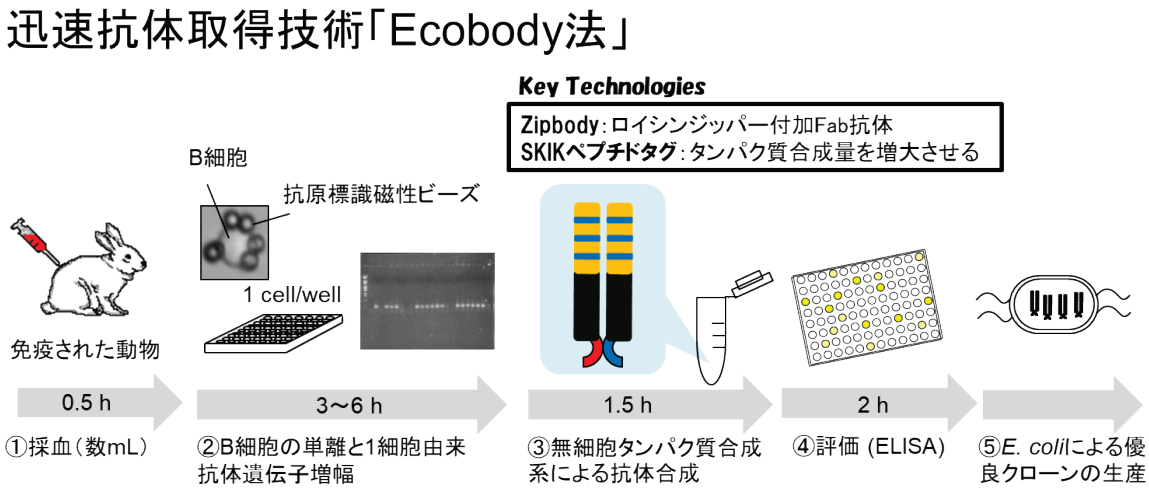
Rapid screening of monoclonal antibodies from single B cells and mass production in *Escherichia coli*

○加藤 晃代[1]、兒島 孝明[2]、中野 秀雄[2] ([1]名城大農、[2]名大院生命農)
○Teruyo KATO[1], Takaaki KOJIMA[2], Hideo NAKANO[2] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

モノクローナル抗体（mAb）は，ある特定のエピトープを認識し結合する単一の抗体クローンであり，研究のみならず診断・医薬分野でもその重要性が増している．そのため，目的抗原に対して高い親和性および特異性を有する mAb をより簡便かつ迅速に取得し，さらに得られた mAb を低コストで大量生産するための技術開発が求められている．

mAb 取得法として良く利用されるハイブリドーマ法や，近年開発されている B 細胞から直接 mAb 遺伝子を取得する技術は，動物の免疫反応に加え，mAb の生産・評価に必要な動物細胞培養に数日以上かかるという点が迅速化の最大の妨げとなっている．

一方で当研究グループは，動物末梢血から単離されるシングル B 細胞を材料として，1 細胞の逆転写反応と PCR，および大腸菌無細胞タンパク質合成系による mAb 合成を組み合わせた，迅速かつ低コストな mAb 取得技術「Ecobody 法」と，大腸菌による mAb 生産技術確立を目指し研究開発をすすめてきた．Ecobody 法においては、B 細胞の単離から mAb 評価までが全て *in vitro* で行われ，生細胞の形質転換や培養が不要であるため，操作が単純で迅速（2 日間以内）・低コストであることが最大の特徴である．本講演では Ecobody 法の概要と，タンパク質合成量を増大可能な N 末端 SKIK ペプチドタグの応用など，最近の研究成果について紹介する．



＜参照論文＞*Sci rep*, **7,** 13979 (2017), *J Bioeng Biosci*, **123,** 540 (2017), *J Immunol Methods,* **427,** 58-65 (2015)

monoclonal antibldy, single B cell technology, Escherichia coli

発表責任者：加藤晃代（teruyok@meijo-u.ac.jp）

講演番号：4SY18-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A11 会場

大腸菌遺伝暗号の改変によるタンパク質機能・構造の多様化

Genetic code expansion in E. coli for creating novel protein functions and structures

○坂本 健作（理化学研究所）
○Kensaku Sakamoto (RIKEN)

タンパク質を構成するアミノ酸の種類を拡大することで、タンパク質の機能・性状の改善や、新規な活性の賦与が可能になる。非天然型アミノ酸を特定のコドンにアサインし、遺伝子中にあらかじめ導入部位を指定しておくことで、タンパク質に部位特異的に導入する技術を「拡張遺伝暗号技術」と呼ぶ。2001 年に大腸菌の遺伝暗号拡張が米国の研究グループから報告され、翌年に独立にわれわれが動物細胞において非天然型アミノ酸の導入に成功した。さらに、大腸菌導入技術については 2010 年以降本質的な進展がみられている。従来は、UAG 終止コドンを非天然型アミノ酸にアサインする際に、UAG コドンを認識してタンパク質合成を終結させる分子 RF-1 が大腸菌内に存在した。RF-1 は、UAG コドンで終結する約 300 の遺伝子の発現に必須な因子であるが、UAG コドンをゲノムから除去することでノックアウトできることが初めて発表者らのグループによって示された。この結果、原理的には 100%の効率で UAG コドンを非天然型アミノ酸に翻訳することが可能になり、１つのタンパク質分子中に何か所でも非天然型アミノ酸を部位特異的に組み込むことができるようになった。コドンの意味を変えることで多くのタンパク質のアミノ酸配列が同時に変わってしまい、その結果致死になるというディレンマは、ゲノム改変技術の進歩によって解決できることがわかった。発表者らはこのアプローチをセンス・コドンにも拡張して、AGA アルギニン・コドンを非天然型アミノ酸のコドンに改変することにも成功している（2015 年）。このようにして開発された大腸菌株は、UAG と AGA の２つのコドンが改変された遺伝暗号を持ち、2 種類の非天然型アミノ酸を同時にタンパク質に導入することができる。普遍遺伝暗号には 20 種類と翻訳終結を合わせて 21 通りの意味に 64 コドンを充てるという重複性があるが、ゲノムとコドン改変を同時に行うことで、１つの遺伝暗号系にさらに多くのアミノ酸をコードできる可能性が出てきた。遺伝暗号の改変によって、新しいタンパク質工学の展望も開けてきた。発表者らは、ハロゲン化チロシンを複数個所に導入することで酵素の熱安定性を改善できることを報告したが（2011 年）、さらにヒドロキシ酸を主鎖に組み込むことで、酵素切断に依存しないプロエンザイムの自己活性化機構を組み込むことにも成功している。耐熱性と自己活性化能は、このように 2 種類の非天然型コンポーネントをタンパク質に導入することで、同一の酵素内で実現させることが可能になった。生物の遺伝暗号拡張を活用すれば、進化工学的に新規タンパク質機能や構造を創出することも可能だろう。このような合成生物学的アプローチは、生物の生み出す分子の多様性の増大させることに役立つだろう。

genetic code, protein engineering, non-natural amino acid

発表責任者：坂本健作（kensaku.sakamoto@riken.jp）

講演番号：4SY18-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A11 会場

合成代謝経路構築によるシアノバクテリアのバイオアルコール生産
Bioalcohol production by cyanobacteria with synthetic metabolic pathway

○花井 泰三、広川 安孝 (九大農)
○Taizo HANAI, Yasutaka HIROKAWA (Kyushu Univ.)

光合成微生物のシアノバクテリア（らん藻）による物質生産においては、シアノバクテリアが本来生産する代謝物の増産をめざしたスクリーニングや培養条件の検討が行われてきた。しかし、近年、大規模な遺伝子組換え技術を利用し、シアノバクテリアが本来生産しない化学物質を、導入した外来遺伝子で構築した合成代謝経路により人工生産させることが可能になってきた。この方法の利点は、生産物が培地中に排出されるため、生産物が細胞内に蓄積するオイル産生藻類などとは異なり、長期間の継続生産が可能な点にある。また、藻類による燃料生産におけるコストの要因である藻体回収は不要となる。

我々の研究室では、合成代謝経路を導入したシアノバクテリアを利用し、汎用化学物質生産を目指して研究を進めている。そこで、まず、我々が大腸菌で 100g/l 以上生産させることに成功しているイソプロパノールをモデルターゲット生産物として、*Synechococcus elongatus* PCC7942 をモデルシアノバクテリアとして、大量生産させることを目指した。具体的には、①シアノバクテリア内に合成代謝経路を構築し、②この代謝経路をメタボローム解析と数理モデルにより最適化し、③合成代謝経路を構築したシアノバクテリアの増殖を、培養条件や基質添加により効率化し、④イソプロパノール高生産株・高耐性株を、シアノバクテリア磁気分離法により選抜し、⑤イソプロパノールの生産量と回収率の向上のため、フォトバイオリアクターとガスストリッピング法を適用するという、研究項目について、研究を進めている。本シンポジウムでは、特に、①の部分に焦点を絞って、発表したい。

バイオアルコールの一種であるイソプロパノールは、炭素を 3 つ有する 2 級アルコールであり、プラスチックとして広く利用されているプロピレンの材料になることから、重要なターゲット物質である。我々は、大腸菌で最もイソプロパノールを生産することが明らかとなっている合成代謝経路を相同組換えにて、*S. elongatus* PCC792 のゲノムに導入した。この株は、明条件かつ好気状態で増殖させた（前培養）後に、培養液を暗条件かつ嫌気状態に移すことで、9 日間で 26.5mg/L のイソプロパノールを生産することが確認できた。濃度は非常に低いが、我々の知る限り、これは、シアノバクテリアを用いた炭酸ガスからイソプロパノール生産の最初の研究例である。同様の方法で、イソプロパノールの他に、ポリマーの材料として利用できる 1,3 プロパンジオール (1.22 g/L)、乳酸 (1.27 g/L) を二酸化炭素から直接生産することに成功している。

本研究は、JST、CREST の支援を受けたものです。

synthetic metabolic pathway, cyanobacteria, bioproduction

発表責任者：花井泰三（taizo@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4SY18-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A11 会場

非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学

Evolutionary synthetic biology of non-natural triterpenoid pathways

○梅野 太輔（千葉大院工）
○Daisuke Umeno (Chiba Univ.)

トリテルペノイドは自然界に数万を数える化学構造を擁し，なかには，数多くの生理活性物質が知られている。トリテルペンを持たない大腸菌を宿主としたこれらの生合成経路を自由に構築できれば，生産から分離回収までを低コストで行うことが可能となる。しかし大腸菌は，前駆体供給や蓄積能，酵素反応環境において改良の余地が多々ある。これを克服するための努力が精力的に続いているが，本講演では，我々の始めた自前の努力を中心に，大腸菌内でのトリテルペノイド経路の代謝工学の諸問題について議論する。
興味深いことに，膨大な数を誇るトリテルペンの全てが，スクアレンというたったひとつの前駆体によって創られる。本講演では，非天然サイズのスクアレンの生合成経路の構築，そしてこれらの効率化、特異化についてもお示ししたい。これらの経路によって，効率的に，しかも選択的に様々なサイズのスクアレン「様」分子を環化・修飾酵素にフィードすることによって，迅速に数多くの新規化合物が得ることができた。

squalene, molecular breeding, directed evolution

講演番号：4SY18-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A11 会場

DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術

A novel breeding method; genome rearrangement induced by multiple DNA double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*.

○池内 暁紀[1]、中村 里沙[1]、田中 秀典[1]、村本 伸彦[1]、中村 隆宏[2]、小田 有沙[2]、太田 邦史[2]（[1]豊田中研、[2]東大院総合文化）
○ Akinori Ikeuchi[1], Risa Nakamura[1], Hidenori Tanaka[1], Nobuhiko Muramoto[1], Takahiro Nakamura[2], Arisa Oda[2], Kunihiro Ohta[2] ([1]TOYOTA CRDL, INC., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo)

持続可能な社会を目指し、再生可能な資源である植物バイオマスを微生物プロセスにより低コストで燃料や化成品に変換するためには、微生物の物質生産性を飛躍的に向上させる育種技術が必要である。特に、実用プロセスで重要となる耐熱性や阻害物耐性などの量的形質は、複数の遺伝子が複雑に関与するため、従来の少数の遺伝子を標的とした育種技術では限界がある。

一方、生物進化の歴史に着目すると、比較ゲノム解析により、DNA の二本鎖切断（DSB）により誘発される染色体の欠失、重複、転座などのゲノム再編が生物進化の駆動力となった可能性が示唆されている。減数分裂期の Spo11 に始まる計画的 DSB により生じるゲノム再編は、遺伝的多様性獲得の要因となり、遺伝子発現の変動をもたらす事で、生物は様々な環境に適応進化してきたと考えられる。しかし、体細胞分裂期において複数の DSB が生じた際のゲノム動態への影響については未解明の部分が多い。

我々は、高度好熱菌由来の耐熱性制限酵素 *Taq*I を体細胞分裂期の細胞内で発現させ、人為的にゲノム再編を誘発する「TAQing システム」を開発した。*Taq*I は、4 塩基認識の多頻度切断酵素であり、至適温度が 65℃であるため常温では低い活性しか示さない。よって、加温により DNA 切断活性をコントロールする事で DSB を誘導する事が出来る。また、切断配列がわかっているので、ゲノム再編部位の同定が容易である。本系による DNA 切断のゲノム動態に及ぼす影響を解析した結果、減数分裂期の DSB とは異なり、染色体の重複、欠失、転座などが起こりやすく、ゲノム再編による遺伝的多様性を作り出す新たな育種技術となる可能性が示唆された。

そこで本系を用いて、キシロース資化能を付与した出芽酵母のゲノム再編ライブラリを作製し、キシロース培地・高温環境下で複数回集積培養を行った。その結果、40℃で効率的にキシロースからエタノールを生産する酵母を短期間で育種する事に成功した。タイリングアレイによる CGH 解析により、親株とのゲノム構造を比較した結果、複数の染色体レベルのコピー数多型とゲノム再編が検出され、これらのゲノム構造の変化によりキシロース資化能力と耐熱性が向上した可能性が示唆された。

TAQing システムは、耐熱性制限酵素を細胞内で発現するだけで、簡便にゲノム再編を誘発できる。また、酵母だけでなく、植物を用いた研究でも大規模なゲノム再編が誘発され、次世代にゲノム構造の変化が伝わる事が分かっている。今後は、酵母以外の産業微生物や実用植物など様々な生物の形質を改良する育種への応用が期待される。

genome rearrangement, breeding method, yeast

発表責任者：池内暁紀（e1412@mosk.tytlabs.co.jp）

講演番号：4SY18-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ A11 会場

麹菌を用いた物質生産における万能な分子育種を目指したゲノム編集技術の確立

Versatile multiple gene-targeting technology via genome editing in industrial production using the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）
○Jun-ichi Maruyama (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

伝統的醸造産業に使用されてきた糸状菌である麹菌 *Aspergillus oryzae* は、酵素生産や組換えによる異種有用タンパク質生産に用いられているとともに、最近は天然物の異種生産の利用への可能性が示されている。このような物質生産に有用な麹菌において、生産性が高い、生産物の品質がよいというような優良性質をもつ株の育種は重要である。

これまでに我々は、麹菌の分子育種の基盤となる数々の宿主・ベクター系を開発してきた。実際には、複数の遺伝子を改変しなければ産業的に必要とされる生産性を達成できないことから、導入可能な形質転換マーカーを増やしたがその数には限界がある。これに対して、非相同組換えの不活性化と形質転換マーカーのリサイクリングを利用した効率的な多重遺伝子破壊を行うことで、異種タンパク質の生産能力を増強することに成功した。一方で、従来の麹菌の分子育種においては、実験室での使用が容易な特定のモデル株において集中的に試みられてきた。しかし、産業的な生産に適した株は 1 つではなく、それぞれの株に対して上述の育種アプローチを 1 から行うのは現実的ではない。

このような背景のもと我々は、麹菌を用いた物質生産での自由自在な遺伝子改変を可能とするため、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を確立した [1)]。CRISPR/Cas9 システムはヌクレアーゼである Cas9 とガイド RNA を利用して、ゲノム上の任意の部位に対し変異を導入する方法である。ゲノム編集のなかでも、低コストで簡便な技術として特に注目され、動物・植物など多くの生物において劇的な遺伝子改変効率の改善をもたらすことで次世代の育種技術として注目を集めている。

これは麹菌においても同様であり、我々はゲノム編集用プラスミドの自律複製を可能とする改変により、麹菌の様々な株において 50~100%の高い変異導入効率を実現した [2)]。またこの際に、産業的に有用な麹菌株をそのまま改変できるよう薬剤耐性マーカーを使用したが、その自律複製プラスミドのリサイクリングによる多重変異導入の方法を開発した [2)]。さらに、CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトとノックインを、標的とする遺伝子座に形質転換マーカーを導入せずに行うことに成功した。すなわちこれは、遺伝子破壊や遺伝子導入を無限に繰り返すことが可能になったことを意味する。

以上により、麹菌の様々な株での自由自在な遺伝子改変が効率よくできるようになり、その物質生産における次世代の分子育種の時代が到来したと考えている。

1) Katayama *et al.* (2016) *Biotechnol. Lett.* Vol. 38, 637-642.
2) 片山琢也ら、2017 年日本農芸化学会大会、2C18p06.

Aspergillus oryzae, genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY19-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A12 会場

データ革命がバイオにもたらすパラダイムシフト
Paradigm shift by the Data Revolution in Bioindusty

○井出 寛子 (一般財団法人バイオインダストリー協会)
○Hiroko Ide (Japan Bioindustry Association)

昨今、ICT 技術の進歩によるデジタル革命、情報革命とも呼ばれる、第４次産業革命がもたらす技術革新、産業構造の変化、社会構造の変化に注目が集まっており、世界各国は医療・ヘルスケアやバイオテクノロジーを活用した産業に対して、イノベーションの推進にフォーカスした政策を打ち出している。

これら革命は、様々な情報だけでなくヒトの感覚、勘、経験、知識、暗黙知などをデータ化・可視化し、繋ぐことがキーポイントの一つであり、言い換えればデータ革命ともいえる。この革命は、IoT や計測技術の進歩によるデータの取得、クラウドによるビッグデータの集積、計算機能力の向上、AI 等による解析技術の進歩などの背景により実現しており、その技術進歩は目覚しいものがある。しかし、革命によりもたらされる革新的イノベーションは、バイオ産業のように、これまで殆どデジタル化されていなかった産業で生まれることになると言われている。

医療・ヘルスケアの分野では、研究開発、製造、臨床の各プロセスにおけるデジタル化が進んでいるのはもちろん、世界各国ではゲノム情報から電子カルテなど臨床情報までを繋ぎ、患者が生成するデータと提供する製品やサービスが相互にフィードバックされる基盤を構築しつつある。

また、米国では、バイオにおけるものづくりや合成生物学の分野において、実験データを情報システムに取り込み、人工知能を活用した解析を用いることにより、設計（Design)、構築（Build)、試験（Test)、学習（Learn）の研究開発サイクル（DBTL サイクル）を数段進化させると共に、サプライチェーンへと展開させつつある。

本講演では、主に海外の政策動向を振り返りながら、イノベーション推進の経緯と、データ革命がバイオ産業に何をもたらしているのかについて国内外の事例を含めて紹介したい。

Digitalization, DBTL cycle, AI

発表責任者：井出　寛子（idehrk@jba.or.jp）

講演番号：4SY19-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A12 会場

人工知能を利用する～創薬の未来

Potential of AI in drug development

○奥野 恭史（京都大学)
○Yasushi Okuno (Kyoto Univ.)

近年、あらゆる分野において爆発的に増大し続けるビッグデータから知識発見や新たな価値を創造する科学技術として、ビッグデータ科学が注目されている。臨床医学ではビッグデータをリアルワールドデータと呼び、規格化された従来の観察研究とは異なり、実臨床の実態に迫る新しい臨床研究のアプローチとしてビッグデータ解析が注目されている。このように多種多様かつ膨大なデータに直面する最中、近年ではこれらビッグデータを解析する技術として人工知能が注目されている。言うまでもなく、人工知能分野そのものは新興の分野ではないが、Google 社の Deep Learning や IBM 社のワトソンの出現により、近年の人工知能技術のパフォーマンスと可能性にさまざまな分野が大きな期待を寄せている。演者は、京大病院がんセンターが集積するがん患者の実臨床データ解析を通じ、治療パターンや患者の副作用、予後などの一連の時系列データを解析することで、がん医療におけるリアルワールドデータからの知識発見と AI 応用に関する方法論の開発に取り組んでいる。本講演では、京大病院におけるリアルワールドデータの解析事例を紹介することで、医療におけるビッグデータ・AI の可能性について議論したい。

Artificial intelligence (AI), Drug development, Deep learning

講演番号：4SY19-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:15～ A12 会場

AI による画像解析： 植物科学への応用

Image Analysis using Artificial Intelligence: Applications in Plant Sciences.

○朽名 夏麿[1,2]、島原 佑基[1,2]、馳澤 盛一郎[2,1] ([1]エルピクセル株式会社、[2]東京大学大学院新領域創成科学研究科)
○Natsumaro Kutsuna[1,2], Yuki Shimahara[1,2], Seiichiro Hasezawa[2,1] ([1]LPixel Inc., [2]Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo)

近年、植物の可視化法や撮像系の開発と普及、画像データベースの構築など、イメージング技術をとりまく状況は日増しに進歩している。今や、細胞内小器官、植物細胞、組織、器官、個体だけでなく、植物細胞内での一分子観察のようなミクロスケールから、ドローンや人工衛星により得られる植物個体群・地球環境のようなマクロスケールに至るまで、イメージング技術はカバーしている状況である。一方、得られた画像を評価・解析する過程については、現在もなお、ほとんどの場合に研究者の目視に頼らざるを得ない。これはイメージングに基づく評価・解析が、さらなる精度とスループットを達成する上での障害となっている。

このような状況下で期待される画像データの評価・解析に対するコンピュータによる支援技術の中でも、最も注目を集めているアプローチである人工知能（Artificial Intelligence; AI)を活用した画像解析について、本発表ではとりあげる。とくに現在 AI の主要な一分野として発展の著しい機械学習はデジタル画像データだけでなく、デジタル化可能なあらゆる生命科学情報(各種の測定値、ゲノム情報、発現量、文献情報など)について自動的な分類や評価を、人間に代わって、あるいは人間と協同して、コンピュータで行なうためのアルゴリズムの総称である。

発表ではまず機械学習を教師付き学習と教師無し学習に大別して紹介する。また、機械学習に共通して必須となる特徴抽出工程について、顕微鏡等の撮像機器により得られる植物画像からいかにして形態や模様を数値化して「特徴」として抽出するのか説明する。そして分類精度の観点で重要度が高く普及している教師付き学習について、代表的アルゴリズムとして k-最近傍法、サポートベクトルマシン、決定木、集団学習、ニューラルネットワークをとりあげる。なお、この数年急速に注目を集める深層学習アプローチの代表格であるディープニューラルネットワークにつき、その原理と、なぜ深層学習が高い性能を備えるのか、従来の機械学習手法との違いはいかなる所にあるのか、その得失はどのような点かについて解説する。

最後に、私たちが開発している能動学習に基く人工知能アルゴリズム CARTA について紹介し、その性能や応用性について従来の手法に対する精度面・コスト面での優位性を示す。

Artificial Intelligence, Machine Learning, Image Analysis

発表責任者：朽名 夏麿（kutsuna@lpixel.net）

講演番号：4SY19-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:55～ A12 会場

バイオ×デジタル融合に向けた AI 技術とスマートセル創製に向けた取組み

Overview of Artifitial Intellegence Technologies toward Bio and Digital fusion

○伊藤 潔人（日立製作所）
○Kiyoto Ito (Hitachi, Ltd.)

次世代 DNA シーケンサをはじめとした計測・分析装置の性能向上により、バイオ分野でもビッグデータ化の波が到来した。こうしたビッグデータと、近年急速に進歩する人工知能（AI）技術とを組み合わせ、バイオ産業を発展させる新しい価値・知見を創出することに大きな期待が集まっている。特に、バイオビッグデータ、AI 技術に加えて、ゲノム合成・ゲノム編集といった最新バイオテクノロジーも活用して、人工的に物質生産能力を高めた生物細胞を生み出す“スマートセル”研究は、ものづくり産業を支える原料生産を革新する技術分野として多大な注目を集めている。

しかし、そうした期待、注目の反面、この分野では AI 技術が十分に活用されているとは言い難い。すなわち、研究開発の現場では、テキストマイニング・機械学習・数理的解析といった AI の要素技術がツールとして使用されているに過ぎず、未だデータ解釈には、熟練した研究者の経験・知識に頼らざるを得ないのが現状である。そこで、本講演では、企業研究者という立場から、バイオビッグデータを活用するため重要な、AI 技術の捉え方、データの活用などの観点を議論する。

講演では、まず、AI 技術を実課題に適用する重要な条件として、「アウトカム（目的のデータ）」「アクション（制御可能なデータ）」「コンディション（条件のデータ）」という 3 種類のデータについて説明する。AI 技術とは、アウトカムを高めるため、コンディションにあわせ、どんなアクションをとればよいか、自動的に判断するアルゴリズムである。こうした 3 種類のデータ、AI 技術の考え方を、実問題への適用例を交えながら紐解いてゆく。最後に、バイオ分野での AI 技術活用に向けた事例として、スマートセル創製に向けた取組みを紹介する。

Artifitial Intellegence

発表責任者：伊藤潔人（kiyoto.ito.kp@hitachi.com）

講演番号：4SY20-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A14 会場

ポリエチレンテレフタレート(PET)分解菌の発見と分解機構の解明

Microbial degradation of poly(ethylene terephthalate) (PET) and its mechanism

○平賀 和三[1,2] ([1]京都工繊大院・工科・応生、[2]現 RITE)
○Kazumi Hiraga[1,2] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]RITE)

石油を原料とする PET は、テレフタル酸とエチレングリコールが脱水縮合したポリマーであり、強度や透明性に優れることから繊維、PET ボトル、フィルムなどに広く利用されている。世界の PET 製品生産量は 7,000 万トンを超えた(2015 年)が、使用済み PET 製品は燃焼や埋め立て処理されている。使用済み PET 製品のうちリサイクルされているのは PET ボトルのみであり、世界でのリサイクル率は PET 製品生産量の数パーセント程度と低く、有効利用されていない。もしも PET が生分解できれば、使用済み PET を有効利用することができる。こうした背景のもと、長年にわたる PET 分解微生物の検索の結果、PET フィルム上に付着しながら増殖し、ほぼ完全に分解するコンソーシアム No.46 を得ることに成功した。本コンソーシアムは非常に安定した PET フィルム分解能を示し、複数の細菌、酵母、及び原生動物から構成されていた。PET フィルム分解表面や、分解産物について化学的に検討した結果、PET フィルム分解の初期反応は、エステル結合の加水分解であると結論された。また、微生物分解に伴って PET 含有炭素の約 75%が CO_2 として放出された。

次に、コンソーシアム No.46 から PET フィルム分解に関わる微生物の分離・特定と役割解析を進めた。初期の解析の結果、コンソーシアム No.46 は PET 主鎖分解菌、PET のモノマーであるテレフタル酸分解菌、エチレングリコール分解菌などから構成されることが明らかとなった。更に解析を進めた結果、同じコンソーシアムから PET フィルムを単独で分解可能な微生物を新たに単離することに成功した。本菌は新種であり *Ideonella sakaiensis* 201-F6 と命名され、約 1 か月で PET フィルムをほぼ完全に分解した。クチナーゼの副反応による PET 分解が報告されていることから、類似遺伝子を本菌ゲノム上に検索した結果、新規な PET 分解酵素(PETase)を見出し、PET 特異的な酵素活性を確認した。本酵素による PET フィルム分解の最終産物は MHET(monohydroxyethyl terephthalate)であったことから、PET 構成モノマーまで分解可能な他の遺伝子が存在すると推察し、PET 依存的に発現誘導される遺伝子を調べた結果、エステラーゼ様の新規な MHET 分解酵素(MHETase)を見出し、酵素活性を確認した。以上、本菌は PET を PETase が加水分解して MHET とし、更に MHETase が作用して PET 構成モノマーであるテレフタル酸とエチレングリコールに分解し、資化することが明らかとなった[1,2]。

本シンポジウムでは、PET 分解菌のスクリーニングの経緯と新規 PET 分解菌の単離、及び新規な PET 分解酵素群による PET フィルムの分解機構 等について報告する。[1] Yoshida S., Hiraga K., Oda K., *et al. Science*, 351, 1196-1199 (2016).[2] Yoshida S., Hiraga K., Oda K., *et al. Science*, 353, 759-c (2016)

poly(ethylene terephthalate), degradation, Ideonella sakaiensis

発表責任者：平賀和三（khiraga@rite.or.jp）

講演番号：4SY20-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A14 会場

ペプチドグリカンの新しい生成機構

Glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis

○大利 徹（北大院工）
○Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

微生物の一次代謝経路はモデル微生物を用いて解明され普遍的に存在すると考えられてきた。しかし個々の菌株のゲノム配列が明らかになるにつれ、一次代謝経路であっても多様性があることが分かってきた。例えばイソペンテニル 2 リン酸の生合成経路は、出芽酵母を用いて明らかにされメバロン酸経路として知られていたが、大腸菌では 2-*C*-Methyl-D- erythritol-4-phosphate 経路を用いることが明らかにされた。筆者もメナキノン [1] や葉酸の部分骨格であるパラアミノ安息香酸 [2] の新規生合成経路を見出した。さらに最近、ペプチドグリカンを生合成する際、イネ白葉枯病菌（*Xanthomonas oryzae*）に代表される一部の菌株は、新規なグリコペプチジルグルタミン酸エピメラーゼを利用することを見出したので紹介したい [3]。

微生物ペプチドグリカンの 1 ユニットは、UDP-*N*-Acetylmuramic acid（UDP-MurNAc）にペンタペプチド（L-Ala-D-Glu-meso diaminopimelat-D-Ala-D-Ala) が結合した中間体からなる。この生合成に用いられる D-Glu は、グルタミン酸ラセマーゼや D-アミノ酸アミノトラスフェラーゼにより供給される。しかし、前述の *X. oryzae* が両遺伝子を持たないことから、D-Glu 要求性大腸菌と *X. oryzae*（MAFF311018）のゲノム DNA を用いたショットガンクローニングを行った結果、XOO_1319 と XOO_1320 の両遺伝子で相補された。前者は機能未知であるが、後者は MurD（UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu を付加する酵素）と相同性を有していた。反応機構を明らかにするため、XOO_1319 と XOO_1320 の組換え酵素を調製し、最初に両酵素が L-Glu のラセミ化活性を持つか検討したが、何れも活性は検出できなかった。次に、MurD に相同性を示した XOO_1320 が、予想される反応である UDP-MurNAc-L-Ala への D-Glu の付加反応を触媒するか検討した結果、コントロールとして用いた大腸菌の組換え MurD は高い活性を示したのに対し、XOO_1320 では微弱な活性しか検出できなかった。そこで、上述の相補実験で 2 つの遺伝子が必須であった事実から、XOO_1319 と XOO_1320 の両組換え酵素と UDP-MurNAc-L-Ala と L-Glu を基質に用いて反応を行った結果、効率よく UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu が生成した。詳細に解析した結果、XOO_1320 が UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu ではなく L-Glu を付加し MurNAc-L-Ala-L-Glu が生成した後、XOO_1319 が生成物末端の L-Glu を D-Glu に異性化することが分かった [3]。

[1] ***Science***, **321**, 1670, (2008), [2] ***J. Biosci. Bioeng***., **117**, 178 (2013), [3] ***J. Am. Chem. Soc***., **139**, 4243 (2017).

peptidoglycan, biosynthesis, glycopeptidyl-glutamate epimerase

発表責任者：大利　徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY20-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:55～ A14 会場

アミノ酸の代謝制御機構と生理的役割に着目した酵母の高機能開発
Functional improvement of yeast based on metabolic regulation and physiological role of amino acid
○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. & Tech.)

微生物におけるアミノ酸代謝とその制御機構は生育環境や代謝様式などで異なり、複雑かつ頑強なネットワークを形成し、様々な代謝経路・産物やシグナル分子の制御系とのクロストークも存在する。基礎科学としては、それらの仕組みを解明し、生命現象を理解することが重要である。一方、アミノ酸含量の人為的制御により、発酵食品・エタノール・有用物質などの生産性改善、食品の高付加価値化（味・風味の差別化、健康機能性の向上など）が期待できる。本講演では、酵母に見出したアミノ酸の代謝制御機構と生理機能に着目し、酵母の高機能開発（スマートセル化）を試みた例を紹介する。
プロリン（Pro）・アルギニン（Arg）：Pro を細胞内に蓄積する株を解析し、Pro が種々のストレスから酵母を保護すること、グルタミン酸リン酸化酵素 GK のアミノ酸置換（D154N, I150T など）により、フィードバック阻害感受性が低下し、Pro が過剰合成されることを明らかにした。また、パン酵母で Pro を蓄積させると、冷凍・高糖生地の発酵力が有意に向上し、Pro の育種への有用性が実証できた。一方、Pro の生理機能としては、新たに ROS レベルの制御、リボファジーへの関与、細胞寿命の延長などが示唆された。さらに、アセチル化酵素 Mpr1 を介して合成される Arg からフラボタンパク質 Tah18 依存的に一酸化窒素（NO）が合成されること、Dre2 タンパク質が NO 合成を制御することを見出した。NO は転写因子 Mac1 を活性化し、Cu^{+}輸送体 Ctr1 の発現誘導を介した細胞内 Cu^{+}の増加と抗酸化酵素 Sod1 の活性上昇により、高温耐性に寄与すると考えられる。同様の機構はパン酵母にも存在し、Pro と NO の合成系強化により、製パンストレス（冷凍、乾燥）に対する耐性と発酵力が向上した。
バリン（Val）：必須アミノ酸として、またイソブタノール前駆体として重要な Val の高生産を目的に、アセトヒドロキシ酸合成酵素（AHAS）の調節サブユニット Ilv6 にアミノ酸置換（N86A, G89D, N104H）を導入すると、Val による AHAS フィードバック阻害が解除され、細胞内 Val 含量が著しく増加した。また、2 種類の分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素（Bat1, Bat2）を解析した結果、両酵素自身の活性や機能に差はなく、ミトコンドリア局在が効率的な Val 合成や細胞の生育に重要であることが示された。
システイン（Cys）：メタノール資化性酵母 *Hansenula polymorpha* はグルタチオン（GSH）や組換えタンパク質の高生産宿主として有用である。今回、本酵母のセリンアセチル基転移酵素（HpSAT）について分子機能や生理的役割を解析した。その結果、HpSAT は大腸菌 SAT に比べ、活性は低いものの、Cys によるフィードバック阻害をほとんど受けなかった。また、ミトコンドリア局在が活性発現に必要なこと、多くの細菌や植物と同様に Cys や GSH の合成などの硫黄代謝に関与することが判明した。

yeast, amino acid, cellular function

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4SY20-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A14 会場

芳香族アミンの発酵生産プラットフォームを活用したポリマー生産

Microbial platform fermenting aromatic amines and polymer synthesis

○高谷 直樹[1]、金子 達雄[2]、桝尾 俊介[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]北陸先端科学技術大学院大学・環境・エネルギー領域)
○Naoki Takaya[1], Tatsuo Kaneko[2], Shunsuke Masuo[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]JAIST)

バイオプラスチックは持続可能社会の実現のために重要な素材であり、使い捨て材料などを中心に用途が拡大しつつある。一方で、その用途の拡大のためには、従来のものとは異なる新たな高耐熱・高硬度バイオプラスチックの開発が不可欠である。我々は、この課題の解決のために、糖を原料として微生物生産可能であり、高性能ポリマーへと化学重合できるモノマー分子を設計した。その結果、高性能プラスチックとして利用される芳香族ポリアミド・イミドなどの原料モノマーとして期待される *p*-アミノ置換型の芳香族アミン化合物を、微生物生産のターゲットとすることを着想した。

ある種の放線菌は、クロラムフェニコールの生合成中間体として芳香族アミンである 4-アミノフェニルアラニン（4APhe）を産生する。この生合成に関わる *papABC* 遺伝子をフェニルアラニン高生産菌（大腸菌）に導入することでブドウ糖を原料として 4APhe を発酵生産させることに成功した。さらに、データベース上の細菌由来オルソログの利用や培養条件の検討により g/L オーダーまで生産性を改善した。また、様々な代謝酵素遺伝子の探索と利用によって、これを基盤とした様々な芳香族アミン生産のプラットフォームを構築した[1]。特に、4-アミノ桂皮酸（4ACA）は、光重合による二量化（トルキシル化）を経て様々な芳香族ポリアミドやポリイミドへ重合可能であった。特に、芳香族ポリアミドは、汎用透明樹脂であるポリカーボネートと同等の透明度、ガラスを越える力学強度、高い耐熱性（250℃）を示したことから[2]、自動車などの輸送機器の軽量化やフレキシブルパネル材料などの幅広い工業用途が期待される。現在、低コストバルク生産系の構築、バイオ 4ACA を利用した透明ポリイミドの合成・材料化[3]、他のバイオ芳香族アミンの材料化[4]にも取り組んでいる。

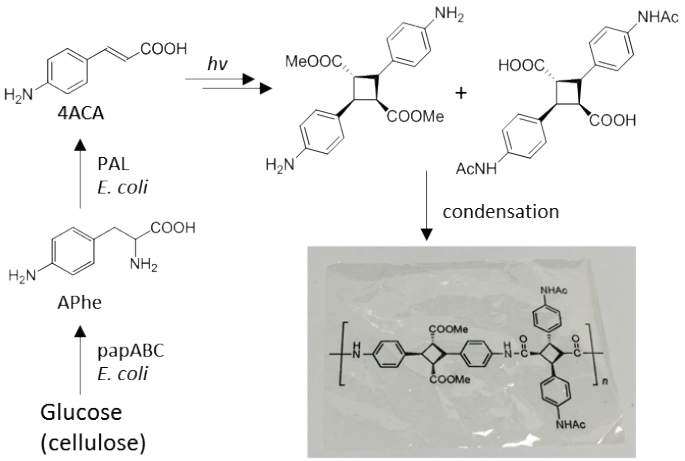


図 バイオマス由来の透明高耐熱性ポリトルキシルアミドの生産

1) Masuo, S., et al., *Sci. Rep.* **6,** 25764 (2016)
2) Tateyama, S., et al., *Macromolecules* **49,** 3336−3342 (2016)
3) Suvannasara, P., et al., *Macromolecules* **47,** 1586–1593 (2014)
4) Kawasaki, Y., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)

aminocinnamic acid, polyamide, Escherichia coli

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4SY20-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:55～ A14 会場

人工代謝経路の創製による有用化合物の生産
Valuable compound productions with constructing artificial metabolic pathways

○白井 智量 (理化学研究所)
○Tomokazu Shirai (RIKEN)

国連気候変動枠組み条約第 21 回締約国会議（COP21）において採択された「パリ協定」での温室効果ガスの削減目標の批准に向けて、非化石原料の活用技術の開発は喫緊の課題である。その中で、植物バイオマスなどを炭素源として有用化合物を生産するバイオ合成技術の発展が目覚ましい。代謝工学や合成生物学と呼ばれるこれらの技術により、微生物発酵の原理を利用して多くの化合物が生産されてきた。しかしながら、実際には生合成可能な化合物を化石資源由来の化合物の代替として利用するか、その後の多段の化学工程を経て産業上の有用化合物を得ることがほとんどである。市場ニーズに合致した製品の規格にするために多段の化学処理を施すことにより、その工程で多くのエネルギーやコストがかかってしまい、直接二酸化炭素の削減に繋がらない現状がある。したがって、産業上有用な化合物そのものをバイオ合成することができれば、途中のエネルギーコストを下げることができ二酸化炭素の削減効果も高くなると期待できる。また、本発表で挙げるイソプレンのように、既知の経路を利用するだけでは理論収率が低く高い生産性が望めない場合がある。

イソプレンはナフサ熱分解の副生成物として工業的に生産され、自動車タイヤなどの原料として使われる合成ゴム（ポリイソプレンゴム）の原料として使用される。バイオマス原料からの発酵によるイソプレン生産が可能となれば、石油への依存度低減、地球温暖化の原因とされる二酸化炭素削減が期待できる。イソプレンは天然ゴム（ポリイソプレン）のモノマーとして、また、二次代謝産物の構造単位として幅広い生物の細胞内に存在しうる物質であるが、その合成経路は多くの酵素と ATP を必要とするため、効率のよい発酵生産のためには新たな生合成経路の導入が望まれる。

本研究においては、まず効率の良い人工代謝経路を設計するツール：BioProV を開発した。このツールは、コンピュータに学習させた既知の酵素反応パターンにもとづき、非天然の化学反応を予測設計できる。この BioProV を用いてイソプレンの新奇な人工代謝経路を設計した。さらに、酵素工学的手法を用いて対象酵素に合理的に変異導入を施し、提案された人工代謝経路を実現した。

これらの合成生物学的な手法は欧米を中心に世界中で研究開発が進んでおり、AI 技術の導入により、今後ますます効率的になり開発期間が短縮されることが予想される。そのためには基盤となる質の良い情報データが必須である。本発表では、この情報を充実させ得る、未知の有用反応を持つ微生物の新規スクリーニングの必要性と可能性についても提案したい。

metabolic engineering, synthetic biology, artificial metabolic pathway

発表責任者：白井智量（tomokazu.shirai@riken.jp）

講演番号：4SY20-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:20～ A14 会場

MD シミュレーションを用いた機能性タンパク質の高機能化法の開発
Refinement of Functional Protein by Molecular Dynamics Simulation

○亀田 倫史（産総研・人工知能）
○Tomoshi KAMEDA (AIST)

蛋白質や核酸の機能を立体構造の観点から理解することは、理学としてのみならず、工学の観点からも重要である。X 線結晶解析、NMR、電子顕微鏡などの手法によって、生体高分子の立体構造が解かれており、それを元にした機能の理解が進んできた。一方で、それらの立体構造を元にした、分子シミュレーションを用いた研究は、あまり進んでこなかった。厳密にいえば、理学的な意味での生体高分子の機能解明に用いられる例はあっても、応用面、例えば、酵素と基質の相互作用様式の解明、酵素の機能改変、耐熱性設計など、蛋白質の高機能化に用いられることは、少なかったと思われる。

その原因は、これまでのスーパーコンピューターでは、計算機資源が乏しいため、分子の動きを調べるために十分な時間を取ることができず、多数の変異体の計算などを行うことができなかったことが大きいと考えられる。また、計算に用いるエネルギー関数の精度に問題がある可能性が指摘されてきた。

しかし、最新の研究によると、エネルギー関数の精度は十分高いことを示している。David Shaw らは、Anton という世界最速の計算機を開発し、それを用いて、12 個の蛋白質を変性構造から天然構造に巻き戻らせることに成功しているし[1]、蛋白質と薬物分子を混ぜた状態からシミュレーションを行ったところ、正しい位置に薬物分子が結合することを示した[2]。つまり、エネルギー関数の精度には問題がなく、あとは計算資源さえ確保できれば、生体高分子の機能をシミュレーションから予言できる可能性を示したわけである。それを受けて、我々は、RNA 二重らせん構造の熱安定性（ΔG）をシミュレーションから求めたところ、計算値と実験値との相関が 0.98、絶対誤差が~0.55kcal/mol と、計算で得られる値は、実験で得られる値とほぼ同等の精度を持つことを示している[3]

本発表では、まずシミュレーションに関して、その手法と現状を概観する。その後に、これまで、我々が取り組んできた分子動力学シミュレーションを用いた研究を紹介する。最後に、現在取り組んでいる蛋白質の高機能化法の開発について紹介する。

[1] Kresten Lindorff-Larsen et al., *Science* 28 Oct 2011:334, 6055,517-520
[2]Shan Y et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 2011, 133 (24), pp 9181-9183
[3]Sakuraba S et al., *J Phys Chem Lett* (2015) Nov 5;6(21):4348-51

Molecular dynamics simulation, protein, enzyme

発表責任者：亀田倫史（kameda-tomoshi@aist.go.jp）

講演番号：4SY21-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A15 会場

ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養系を用いた腸内常在菌の機能解析

Functional analysis of intestinal indigenous bacteria using high throughput culture system of the most dominant human gut microbes.

○栗原 新（石川県大生資環）
○Shin Kurihara (Ishikawa Prefectural Univ.)

ヒトは腸管内に自らの 10 倍の細胞数、150 菌種以上の細菌からなる腸内常在菌叢を保持している。腸内常在菌は炎症性腸疾患や大腸がんなど腸に関連する疾患のみならず、肥満、自閉症など腸とは一見無関係な疾患にも影響を与えていることが報告されている。腸内常在菌の菌体そのものは大腸の免疫機構に阻まれてごく一部しかヒト組織に接触できない。これとは対照的に腸内常在菌の代謝産物は、腸管上皮を通過して体内に取り込まれ、ヒト健康に対してより直接的な影響を与えることから、腸内環境の大部分は腸内常在菌の代謝産物によって決定されていると考えられる。石川県立大学腸内細菌共生機構学寄附講座（IFO）では、細菌と動物という分類学上の「界」を越えてやり取りされ、その共生を支える物質（例えば腸内常在菌の代謝産物）を「シンビオジェニック因子」と命名し、その産生機構の解明と腸管内濃度の制御を目的として研究を行っている。

近年報告されたヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種（Nature, 2010, 464:59–65.）のうち 44 種についてはその基準株が菌株保存・分譲機関から入手可能である。しかし、菌株保存・分譲機関が各菌株の培養に推奨する培地は菌種間で様々であり、その材料には入手困難なものも多いために培養のハードルは高く、優勢種同士の代謝産物産生能の比較なども困難である。これらの問題を解決するため本研究では、腸内細菌培養培地として知られる Gifu Anaerobic Medium（GAM）を標準培地として用い、ヒト腸内細菌最優勢種の生育の可否を調べた。この結果、試験を行った 44 菌種のうち 32 種が GAM で培養可能であり、これはヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種の 57%、入手可能な 44 種の 79%であった。そこで、これら 32 種を 96 穴プレート上で一斉に生育させることの可能なハイスループット培養系を作成した。

この解析系を用いて腸内常在菌の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸の培養上清中の濃度を解析し既知代謝系ホモログの有無を比較・統合したところ、既存の研究結果とよく合致していた。次に、腸内常在菌の重要な代謝産物であり、これまでに炎症抑制・認知力向上・寿命延伸効果が認められているポリアミンについて、その培養上清中の濃度と細胞内の濃度を解析した。得られた結果とヒト腸内常在菌最優勢 32 種のポリアミンの既知代謝・輸送系ホモログの有無とを比較・統合したところ、多くの菌種が未知のポリアミン代謝・輸送系をもっていることが明らかとなった。また、この研究の過程で 5 菌種がフェネチルアミンをその培養上清中に多量に蓄積することが明らかとなった。

腸内常在菌の培養と生菌体を用いた解析は、その後の生化学的・遺伝学的解析に必要不可欠であり、ポストマイクロビオーム時代の腸内常在菌の機能制御に向けた重要な一歩であると考えられる。

gut microbe, polyamine, bacterial culture

発表責任者：栗原新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：4SY21-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:40～ A15 会場

異属細菌間の相互作用がもたらす放線菌特殊代謝

Specialized metabolism induced by inter-generic bacterial interaction

○浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Shumpei Asamizu, Hitoyasu Onaka (Univ. of Tokyo)

微生物は、住む環境のダイナミックな変化に対し、様々な特殊代謝（＝二次代謝）を利用し適合するように進化してきたと考えられる。放線菌は、従来から医薬・農薬の資源生物として、二次代謝に極めて長けている役者として知られ、産業微生物としての側面が注目されてきたが、二次代謝の生態学的機能に関してはその多くが未解明である。また最近のゲノム研究から、放線菌の潜在的二次代謝化合物の構造多様性は、我々の知見をさらに超えると予想されているが、一方で、実験室レベルでの培養では、その能力を発現させ、活用する術は限られている。

放線菌がゲノムに維持する実験室培養で発現しない潜在的二次代謝は、元々いた自然生育環境中では環境への適合に用いられていたことが考えられ、様々な環境適合の中でも、異属微生物の活動が引き起こす動的な環境変化は、それに対応するための特殊な代謝制御を引き出すと考えている。このことから、細菌間の相互作用（競合と協調）により引きおこる二次代謝誘導の仕組みを明らかにできれば、放線菌のゲノムに眠る潜在的といわれる遺伝子の機能をより効率的に活用できるようになる。

本研究では、異属細菌間相互作用のなかでも、放線菌 *Streptomyces lividans* がミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 のコロニーが接する面でのみ赤色色素生産する現象に注目した。この色素生産誘導は、透析膜を介した培養、培養抽出物の添加、さらに *T. pulmonis* の γ 線滅菌やホルマリン固定した死菌体では起こらなかった。また、*S. lividans* と *T. pulmonis* は液体培養時に共凝集を起こした。これらの結果は、異属細胞間の物理的な接触を介したコミュニケーションが存在するという極めてユニークな機構の存在を示唆している。赤色色素は抗生物質としての作用は弱く、紫外線防御や抗酸化作用などを有することから、この場合、二菌間の協調関係を示唆させるが、特異的なシグナル物質を介さない、異属細胞間の接触を介した相互作用がどうように起こっているのかについては全く知見がない。これまでに、RNA シーケンスを用いた放線菌の複合培養時の網羅的転写解析や、重イオンビームを用いた放線菌変異株ライブラリを作製し、色素生産応答しない放線菌株のスクリーニングを行った。現在、15 万株の胞子ライブラリから、20 株程度選抜し、それらのゲノムリシーケンス解析から変異遺伝子を同定しており、本シンポジウムでは、これらの結果から推定される機構について議論したい。

actinomycete, secondary metabolism, bacterial interaction

発表責任者：浅水俊平（asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY21-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:15～ A15 会場

高度難分解性環境汚染物質分解細菌から微生物進化を探る
Evolution of bacteria degrading highly recalcitrant environmental pollutants

○永田 裕二（東北大学院生命科）
○Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

人類が化学合成し、大量に環境中に放出した非生体化学物質をも唯一の炭素源・エネルギー源として利用できる細菌が存在する。このような細菌の能力は、環境浄化への応用のみならず、生物の環境適応・機能進化機構の解明の観点からも興味深い研究対象である。

代表的な人工合成有機塩素系殺虫剤のγ-hexachlorocyclohexane (HCH) は、「高度に」難分解性の環境汚染物質であり、persistent organic pollutants (POPs) と総称される環境汚染物質のひとつとして、適切な処理のために国際的な取り組みが求められている。我々は、HCH 連用試験圃場から単離された HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株の HCH 分解酵素遺伝子群を同定・解析し、微生物による HCH 分解代謝経路の全貌を世界に先駆けて解明した。本株の HCH 分解代謝経路は「洗練」されておらず、「歴史の浅い」分解代謝系であると推測された。さらに、本株および地理的に異なる場所から単離された他の複数 HCH 分解細菌株のゲノム比較等を通じて、(i) HCH 分解細菌は、特有の ABC トランスポーターホモログなどの HCH 代謝に必要な基本的細胞機能を有する細菌株が、HCH 分解に必須な特殊性の高い酵素遺伝子群を外部から獲得することで世界各地で「独立に」創出されたこと、(ii) 外部からの遺伝子の獲得やそれに伴うゲノム再編成に、特有のプラスミドや挿入配列などの可動性遺伝因子が重要な役割を果たしていること、が強く示唆された。一方、HCH の初期分解過程に関与する脱ハロゲン酵素は、強い選択圧の元で急速に進化している特徴を有していた。

以上、これまでの研究で、HCH 分解細菌が比較的最近誕生し、現在も急速な進化を続けていることを支持する結果を得ると共に、誕生と進化の過程についても「ある程度」推測することができた。しかし、HCH 代謝に「特異的に」利用される特殊性の高い脱ハロゲン酵素遺伝子の起源は未だ不明である。すなわち、当該遺伝子の進化的起源が推測できるような塩基配列は、膨大なゲノム・メタゲノム配列情報にも見出されておらず、微生物が利用できる「環境遺伝子プール」の実体や、そこから細菌が必要に応じて遺伝子を「取り出す」手段など、環境中での細菌の機能進化の核心部分は未だ未解明であり、推定される進化過程の実験的検証もなされていない。さらに、実際の環境中では、分解細菌単独ではなく、非分解細菌との共存でより効率的に HCH 分解を行っていることが示唆されているが、その共存原理は未解明である。我々は、このような細菌の HCH 分解能に関わる様々な「ナゾ」を解き明かしながら、細菌の機能進化に関する普遍的な知見を得、それらを未開拓の微生物機能の効率的開発手法の確立や実際の環境浄化への応用に繋げることを目標に研究を行っている。

evolution, xenobiotics, dehalogenase

発表責任者：永田裕二（aynaga@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY21-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:50～ A15 会場

メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* のゲノム編集と接合型変換
Genome editing and mating-type conversion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*
○金子 嘉信（阪大工）
○Yoshinobu KANEKO (Biotech., Osaka Univ.)

メタノールを炭素源として利用できるメタノール資化酵母は、1969 年に京都大学の緒方らがはじめて自然界から *Kloeckera* sp. （後に *Candida boidinii* に再同定）を分離、報告して以来、 1970 年代には微生物タンパク質供給源として、 さらに 1990 年前半からの遺伝子操作系の整備により異種タンパク生産宿主として利用されてきた。また、メタノールや硝酸塩の資化代謝経路の生化学的・生理学的研究やペルオキシソーム形成の分子細胞学的研究などの基礎生物学的研究材料としても使用されてきた。現在知られている 30 種を超えるメタノール資化酵母中でも *Ogataea polymorpha*（syn. *Hansenula polymorpha*）は古典遺伝学的あるいは分子遺伝学的手法が適用でき、生育上限温度が 50℃と他の酵母より高く、産業利用する上で有利な点がある。本講演では、IFO 寄付講座で *O. polymorpha* の更なる育種技術開発のため実施した CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術の適用および新しい接合型変換機構の発見の成果について紹介する。

O. polymorpha では出芽酵母 *S. cerevisiae* と比べて、相同組換え効率が低いため、遺伝子操作はしばしば煩雑で時間がかかる。この弱点を克服するために CRISPR/Cas9 技術の有効性を検証し、tRNA 遺伝子と融合させたガイド RNA を発現させることで、試験したいくつかの標的遺伝子（*ADE12*、*PHO1*、*PHO11*、*PHO84*）で 17～71％の高いゲノム編集効率を得ることができた。したがって、この CRISPR/Cas9 システムの利用により、*O. polymorpha* の遺伝子操作がより簡便になり、加速されることが期待される。一方、伝統的な交雑による育種を効率よく進める上では接合型などの生活環に関する情報がいまだ少ない。そこで、*O. polymorpha* のドラフトゲノム配列を解析したところ、出芽酵母とは異なる接合型遺伝子座の構成をしていることが明らかになった。α 型の接合型遺伝子（*MAT*α）と **a** 型の接合型遺伝子（*MAT***a**）がセントロメア近傍に約 18 kb 離れて存在し、菌株によっては *MAT*α と *MAT***a** で挟まれた染色体領域が逆向きになった構造を取っていた。いずれの株でも 2 つの *MAT* 遺伝子座のうちセントロメアから遠い方が転写発現していた。また、栄養増殖中は接合型は安定的に維持されるが、栄養飢餓条件で両 *MAT* 遺伝子座の外側に隣接する約 2 kb の逆向き反復配列間での染色体逆位によって接合型が変換した細胞が出現することがわかった。つまり、*O. polymorpha* の接合型変換は 2 つの *MAT* 遺伝子座をもつ点と染色体逆位による変換という点で出芽酵母や分裂酵母の機構とは異なったタイプであり、子嚢菌酵母の接合型の進化過程をたどる上でも重要な知見となった。

methylotrophic yeast, CRISPR/Cas9, mating-type conversion

発表責任者：金子嘉信（kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4SY21-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:25～ A15 会場

微生物の生き様を探る －休眠・覚醒・培養手法の研究を通して見えたもの－

Exploring the way of microbial life through cultivation of uncultured microorganisms

○鎌形 洋一[1,2] ([1] 産総研、[2] 北海道大農)
○Yoichi Kamagata[1,2] ([1]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), [2]Hokkaido University)

私達研究者にとって実験室でたやすくコロニーを作る、液体培地でたちまち生育する微生物が最も便利であり、そうであるがゆえに大腸菌を初めとするいくつかの限られた微生物が歴史的に広く用いられてきた。こうした「簡単に分離培養できる菌」が現代微生物学における生理学・生化学・分子生物学の飛躍的な発展をもたらしたことは疑いようがない。

しかし、広く環境に存在する膨大な微生物種とその機能にひとたび目を向けようとすると、様相は一変する。環境中に存在する微生物の多くが固体培地上でコロニーを形成しない、あるいは液体培地で増殖しないからである。理由はわからずとも、それはかなり以前から明らかだった。とりわけ土壌や海洋の微生物は固体培地での生育が著しく悪いのは良く知られていた。こうした現象は培養を介さない大規模なメタゲノム解析によって鮮明となり、微生物の多くは培養できない（あるいは：できていない）ことが今日の常識となった。それではいったいこれまでの古典的培養手法のどこに問題があるのか、それを克服し新たな培養手法を確立できるのか、というのが演者らのそもそもの問いであった。これに答えるべく、培地調製手法の本質的な問題点を明らかにするとともに、多くの微生物は他の微生物の存在なしに培養できないことを明らかにした。

これとは別に何千年もの間、地下の氷の中に閉じ込められていた微生物を再び蘇生させ培養しながら、微生物には培養できるステージと培養できないステージがあるのではないかという、かつて広く議論されていた問題を再び掘り返す研究に取り組んだ。「休眠と覚醒」というのは響きのよい言葉であるが、微生物は、生きているのか、寝ているのか、死んでいるのかの判定すら難しい単細胞生物である。活発に増殖している微生物細胞に強いストレスを与え、休眠に近い状態を作り出すという試みとともに、それらを再び培養できるようにするための条件を探った。

本講演ではそうした研究を通して見えてきた微生物の生き様や培養手法に隠された問題点について概観したい。

Uncultured organisms, dormant cells, cultivation methods

発表責任者：鎌形洋一（y.kamagata@aist.go.jp）

講演番号：4SY22-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A16 会場

超解像・最新イメージング技術で分かった菌糸生長機構

Super-resolution and new imaging technology reveal hyphal tip growth mechanism

○竹下 典男（筑波大学・生命環境系）
○Norio Takeshita (Univ. of Tsukuba)

細胞は常にその状態を変化させることで、形態変化・生長・移動を行う流動的なシステムである。糸状菌は、菌糸と呼ばれる管状の細胞からなり、先端を伸ばすことで生長する。菌糸の先端生長は、細胞のダイナミックな形態変化を研究するのに最適な対象である。

また、糸状菌は様々な酵素を大量に分泌して生長するため、環境中で分解者として重要な役割を果たし、古くから醸造・発酵に利用され、近年では有用酵素・バイオ燃料生産の産業分野でも利用されている。一方、糸状菌は、動植物や農作物細胞へ貫入し病原性を示すものを多く含むことから、ヒトおよび作物病害の防除のためにも重要である。これら糸状菌の有用性と病原性は、菌糸生長と密接に関連している。

菌糸生長のために必要な膜脂質やタンパク質は、菌糸先端への膜小胞の輸送とエキソサイトーシスによって、菌糸先端の形質膜に供給される。膜輸送には、微小管とアクチン細胞骨格が、中心的な役割を担っている。そして、極性マーカーと呼ばれるタンパク質が、菌糸先端に局在し細胞極性を維持することで、菌糸生長を制御している。

糸状菌の高い酵素分泌能は、菌糸先端での活発なエキソサイトーシスに依存する。エキソサイトーシスによって菌糸先端の形質膜に新たな膜が大量に供給されるにもかかわらず、膜結合性の極性マーカーが拡散せずに極性部位に維持される機構を、超解像顕微鏡を用いた解析で見出した。 その結果、一時的な集合（120 nm）と拡散が観察され、微小管に依存した極性部位の形成とアクチンケーブルに依存したエキソサイトーシスが交互に繰り返して起こることによって、極性マーカーが菌糸先端に維持される機構を発見した（Ishitsuka et al., Science Adv 2015)。

実際に、菌糸の伸長速度が一定ではなく、増減の振幅が見られた。Ca^{2+}の細胞内濃度を蛍光マーカーにより可視化し、経時的に測定したところ、一時的な Ca^{2+}の流入が周期的に起きた。そして、アクチンの重合とエキソサイトーシスが一時的な Ca^{2+}の流入により同調して制御されることで、一連の段階が協調的に進行する先端生長の動的機構が示された（Takeshita et al, PNAS 2017)。

これらの研究は、超解像顕微鏡を含む最先端イメージング技術により、糸状菌の菌糸先端生長がどのようにしてなされるかという、基礎研究のみならず応用研究にも重要な影響を与える疑問に対する理解を発展させた。そして、その成果は、神経細胞や花粉管などの極性細胞を含む細胞一般の生長の理解にも通じるものであった。

fungi, super-resolution imaging, polarity

発表責任者：竹下典男（takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4SY22-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A16 会場

ゲノム編集による麹菌実用株の効率的遺伝子改変

Efficient genetic engineering by genome editing in *Aspergillus oryzae* industrial strains

○片山 琢也、丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）
○Takuya Katayama, Jun-ichi Maruyama (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

近年 CRISPR/Cas9 や TALEN、ZFN といったゲノム編集技術が確立され、効率的な遺伝子改変のツールとして注目されている。これらのゲノム編集技術は対象とする生物のゲノム情報を目的どおりに書き換えることができるため、これまで遺伝子改変が容易ではなかった生物種において特に有効な手段であると考えられている。なかでも簡便なゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 は様々な生物で利用されており、遺伝子改変だけでなく遺伝子の発現制御などにも応用されている。

これまでに様々な糸状菌では複数の形質転換用選択マーカーが開発され、さらに非相同末端結合に関与する遺伝子欠損株の取得によって効率的に遺伝子改変が行われている。しかし、このような効率的な遺伝子改変はモデルである種や菌株に限られており、遺伝学的手法が十分に確立されていない種や自然界から新たに単離された株での遺伝子改変は容易ではない。日本の伝統的醸造食品の製造に用いられてきた麹菌 *Aspergillus oryzae* においても、産業上用いられる数多くの実用株では遺伝子改変に多大な労力と時間を要するという問題があった。そこで我々は CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を *A. oryzae* に応用し、麹菌実用株における効率的な遺伝子改変技術として確立した[1]。

これまでに複数の糸状菌において CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術が確立されているが、一つの株に対して多段階でゲノム編集を行った例はなく、多重変異株を取得するのは容易ではなかった。また、ゲノム編集による遺伝子破壊株の作製時に選択マーカーを導入している場合が多く、破壊できる遺伝子の数に限りがあることが問題であった。本発表ではゲノム編集のさらなる効率化とプラスミドリサイクリングを利用した多重変異株作製法[2]、選択マーカーを利用しない遺伝子破壊・遺伝子導入について紹介する。本研究で確立された麹菌実用株における効率的な遺伝子改変法は、実用株を対象とした解析やより有用な実用株の育種に繋がることが期待される。

1) Katayama *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 38, 637(2016)
2) 片山ら、日本農芸化学会 2017 年度大会、2C18p06

Aspergillus, Genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：片山琢也（akata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY22-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A16 会場

ゲノム、トランスクリプトーム解析で“視る”糸状菌細胞

Genomic and transcriptomic studies to better understand filamentous fungi physiology

○萩原 大祐（筑波大　生命環境）
○Daisuke Hagiwara (Univ. Tsukuba)

次世代シーケンサーが普及し始めて１０年ほどになる。すでに多様なアプリケーションが開発され、微生物研究の多くの場面で活用されている。マシンの高性能化により解析コストが低下し、微生物としてはゲノムサイズの大きい糸状菌を解析するにもハードルが下がったと思われる。そこで、本技術を前提とした研究課題の立案、すなわちゲノミクス解析やトランスクリプトミクス解析で得られたデータを俯瞰し手がかりを掴み、未解析の糸状菌の生命現象の理解につなげる解析例を紹介する。

１）ドラフトゲノムの比較により、*Aspergillus* 属内でごく近縁な一群の種について主要な二次代謝遺伝子を同定した。約半数の二次代謝クラスターが保存
されていたが、代謝産物の有無や発現プロファイルについては多様性を示した。二次代謝の進化的な多様性の原動力を知る上で有効な手がかりとなる。２）ヒト病原菌 *Aspergillus fumigatus* における休眠胞子や発芽誘導胞子（培地添加１h 後）のトランスクリプトームを比較、さらに *Aspergillus oryzae* や *Aspergillus niger* でも同様に解析し、３種間での比較解析をおこなった。発芽誘導時に、３種で共通して強く誘導される遺伝子を見出した。また、休眠機構に関与する転写因子を推測した。同属で保存された休眠打破のメカニズムに迫る。３）胞子着生時の培養温度により、*A. fumigatus* の休眠胞子内のトランスクリプトームが影響を受けるか、比較検証した。低温で着生した胞子には trypacidin 生合成遺伝子群が強く発現しており、産物も著量蓄積していた。また、メラニンの蓄積量も胞子着生時の温度に依存し、環境温度は胞子の性質に強く影響することが明らかになった。４）ある期間をおいて同じ感染者から分離された病原菌 *A. fumigatus* 株のドラフトゲノムを比較したところ、SNPs や小規模なゲノム領域の欠失が見つかった。このような例を幾つか重ねることで、感染中の菌ゲノムのダイナミックな変異動態を推察することができる。

糸状菌は非常に多くの種を含む微生物群であり、糸状菌の生命現象を広く深く理解する入り口として、次世代シーケンサーから産み出されるオミクスデータは有効な探索源となる。したがって、ゲノム、トランスクリプトームデータを活用した解析が普及することで、糸状菌研究がさらに加速すると期待される。本講演が、経験者のみならず、次世代シーケンサー解析に初めて取り組む研究者のガイドとなることを期待している。

Aspergillus, genome, transcriptome

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4SY22-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A16 会場

麹菌のゲノム解析及びメタボローム解析による清酒成分の生産に関わる制御遺伝子の探索
Seeking of regulation gene involved with Sake metabolite production by genome analysis and metabolome analysis.
○織田 健[1]、岩下 和裕[1,2] ([1]酒総研、[2]広大先端研)
○Ken Oda[1], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

清酒は、原料である酒米から麹菌による分解、酵母による変換などの長いプロセスで生成したメタボライトの塊であり、メタボローム解析技術と非常に相性が良い。そのため様々な研究グループでメタボローム解析が開始されている。一方で、麹菌(*Aspergillus oryzae*)のゲノムは公開されてから 12 年が過ぎ、その間、比較ゲノム解析、ポストゲノム解析の結果が多く蓄積してきている。清酒の品質・価値向上やコスト削減のためには、メタボロミクスとゲノミクスの技術や結果を研究や開発にどう活かして行くかが重要である。本シンポジウムでは、麹菌のゲノミクスとメタボロミクス解析の結果により遺伝子の新たな機能を明らかにした事例を紹介するとともに、糸状菌研究への同技術の利用について議論したい。

我々は、所蔵していた 22 菌株に加え、現在、酒造に使用されている各種の種麹から単離した 33 株の計 55 菌株を DNA マイクロアレイにてゲノム DNA を比較して系統解析を行った。さらに各菌株で製麹し、小仕込み試験により製成酒を作製し、メタボローム解析を行った。両方のデータから麹の種類によりグループ分けが出来、菌株のゲノムと醸造用途との間には相関関係があることが明らかとなった。しかしながら、一部の麹菌グループでは、同じ用途にも関わらず成分のばらつきにより、同じグループとならないものがあった。主成分分析の結果、そのばらつきの原因となる成分は、製成酒の苦味成分の 1 つであるアルギニンであった。さらにアルギニンと逆相関する成分を探り、アグマチンが見出された。アグマチンは、アルギニンが脱炭酸された成分であり、人では生合成経路が見出されているが、糸状菌では未発見である。そこで、同じ系統内でアルギニンを生産する株とアグマチンを生産する株のゲノム解析を行い、比較して原因遺伝子を探った結果、2 次代謝生産のキー遺伝子である *laeA* を見出すことが出来た。アルギニンの生産性を確認するため、この遺伝子の破壊株および高発現株を作製し解析した結果、破壊株でアグマチン生産が低下し、高発現株でアルギニンの生産が低下しアグマチンが高生産された。よって、新たにアルギニンの生産性に関わる遺伝子を見出すことが出来た。つまり、清酒の苦味に関する制御系の一部を明らかとした。このように麹のゲノム解析とメタボローム解析とを活用することで、これまでに未解明の清酒成分の生成系、またはその制御系に関わる新たな遺伝子機能を発見でき、育種のターゲットを見出すことができた。麹菌のゲノム中にコードされている遺伝子の半分以上は、機能未知である。遺伝子破壊株などに対してメタボローム解析を適用することで新たな機能を推定する一助となると考えられる。

Aspergillus oryzae, metabolome analysis

発表責任者：織田健（k.oda@nrib.go.jp）

講演番号：4SY22-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A16 会場

プロテオミクスを基盤とした植物バイオマス分解に関わる糸状菌由来新規酵素の探索
Proteomics-based screening of the novel enzymes involved in plant biomass degradation
○志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Motoyuki Shimizu, Masashi Kato (Meijo Univ.)

糸状菌は古くから我が国の発酵・醸造, 酵素や有機酸・抗生物質などの生産にとって不可欠の存在であり, 産業上の重要性はますます高まっている. 特に, 糸状菌は酵素の宝庫といわれ, すでにアミラーゼをはじめ様々な酵素が産業利用されている. 糸状菌は, 植物の貯蔵多糖として知られているデンプンだけでなく, 植物細胞壁を構成するセルロース・ヘミセルロースを分解する酵素を多数有していることから, それら多糖の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御について盛んに研究が行われている. 我々は, デンプン, セルロース, ヘミセルロース（キシラン, マンナン, キチンなど）のみを炭素源にして *Aspergillus nidulans* を生育させた際に生産された細胞外タンパク質を, LC-MS/MS を利用したプロテオーム解析によって網羅的に解析した. その結果, それぞれの多糖のみを炭素源にして *A. nidulans* を培養した場合, Glycoside hydrolase (GH) に属する加水分解酵素のほかに, Auxiliary Activities (AA) や Carbohydrate Esterase family (CE) に属する酵素およびプロテアーゼ, リパーゼなど 582 種のタンパク質が同定された. また, 機能が分かっている酵素とアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さず, かつ, シグナル配列を持つ機能未知タンパク質 (HP) も 82 種生産されていた. 現在, 同定された 24 種の HP をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* および *Escherichia coli* に異種発現させ組換え酵素を調製し, それらの機能を解析することで, 新規な植物バイオマス分解酵素を探索している.

アミノ酸配列レベルで既知の酵素と全く相同性を示さない未知の植物バイオマス分解酵素が, 糸状菌にはまだまだ多数存在していると考えている. 今後, さらに多岐にわたる分野で利用できる糸状菌由来の新規酵素が発見される可能性を秘めている. 本シンポジウムでは, 我々が見出した植物バイオマスの分解に関わる新規酵素の機能および生理学的役割について現在までの知見を紹介する.

Proteomics, Filamentous fungi, Novel enzymes

発表責任者：志水元亨（moshimi@meijo-u.ac.jp）

講演番号：4SY22-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ A16 会場

麹菌異種発現を基盤とする天然物探索研究
Natural product discovery based on *Aspergillus oryzae* heterologous expression system
○浅井 禎吾（東大院総合文化）
○Teigo Asai (Univ. of Tokyo)

新規性の高い魅力的な天然有機化合物の発見は、合成研究や薬理活性評価研究など周辺分野の関心を多いに集め、結果として新規医薬品開発へのモチベーションを飛躍的に高める。最近、このようなインパクトの強い新規天然物の発見は極めて少なくなっている。糸状菌は、ペニシリンを初めとして、数多くの医薬品開発研究を創出する二次代謝物を生産する重要な微生物資源である。そのゲノム上には、通常の培養条件では物質生産に利用されない休眠型二次代謝物生合成遺伝子が数多く存在し、そのなかには既知化合物からは連想されない全く新しい二次代謝物をコードすると予想されるものも数多く存在する。私たちの研究室では、これら未利用生合成遺伝子を活用することで多様な新規天然物を獲得することを目指して研究を行っている。

近年、ゲノム情報の入手が容易になったことや極めて優れた異種発現用の汎用宿主が開発されたことにより、これまで生合成研究の主流であった遺伝子破壊実験から生合成遺伝子の異種発現による機能解析という新しい潮流が生まれた。例えば、北海道大学の及川英秋教授らは、糸状菌の汎用宿主である麹菌内で、複雑天然物の生合成に関わる全ての遺伝子を発現させることで全合成する、生物全合成という画期的な方法論を提示し実践した。これにより、未知の生合成遺伝子クラスターであっても、物質生産に必要な遺伝子を汎用ホストに導入し、ホスト内で機能的に発現させることができれば、それらにコードされる二次代謝物を取得できる可能性が示された。

このような背景を受け、私たちは、独自に分離した昆虫や植物の内生菌のドラフトゲノム情報を基に、ゲノムマイニングによる未開拓の生合成遺伝子クラスターを探索とそれらの麹菌異種発現による新規天然物探索を実践している。本シンポジウムでは、これまでの研究により得られた成果に加え、直面している問題点について発表する。

ゲノム情報を二次代謝物へと高効率で具現化することができれば、新しい研究を生み出すことができる。本発表を糸状菌研究に携わる方に聞いて頂き、問題解決の糸口や、また、新しい研究が生まれるきっかけになればと願う。

natural product chemistry, secondary metabolites, heterologous expression

発表責任者：浅井 禎吾（tasai@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY23-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A17 会場

バクテリアのスフェロプラスト巨大化

Enlargement of bacterial spheroplasts

○西田 洋巳（富山県大）
○Hiromi Nishida (Toyama Pref. Univ.)

発表者の研究室では、バクテリアのスフェロプラストをペニシリンなどの細胞壁合成阻害剤が入った高浸透圧培地において培養することによって、巨大化させている。このスフェロプラストの巨大化においても、多様性が見られ、基礎および応用研究の観点から重要な知見が得られようとしている。例えば、グラム陰性細菌腸内細菌科に属する *Lelliottia amnigena* のスフェロプラストは外膜直径が 30 μm 程度（その場合の内膜直径は 15 μm 程度）まで巨大化し、外膜と内膜の乖離が見られる。なお、内膜内部には、複数の液胞様構造体が観察できる[1, 2]。また、紅色光合成細菌 *Erythrobacter litoralis* のスフェロプラストは直径 10 μm 程度までしか巨大化せず、内部に液胞様構造体も形成しない[3]。最近、*Deinococcus grandis* のスフェロプラストを超巨大化させることに成功した。その細胞サイズは直径が 400 μm 程度まで巨大化し、肉眼で観察できるレベルの大きさに達した。また、内部には巨大な液胞様構造体を一つ有することがわかった。外膜を標的とする抗生物質を培地に添加しても巨大化が阻害されなかったことより、本スフェロプラストは外膜を欠くと考えられる。バクテリアのスフェロプラストの巨大化は内部に形成される液胞様構造体によって強く影響を受けているように見える。これまでに報告されている最大サイズのバクテリアは *Thiomargarita namibiensis* であり、その細胞直径は最大で 750 μm に達する。このバクテリアも細胞内に巨大な一つの液胞様構造体を持っている。そこで次の仮説を提唱する。スフェロプラストは細胞膜を拡張することによって大きくなるが、細胞質量を増やすことには限界がある。そこで、細胞内に液胞様構造体を形成することによって、さらに大きくなることを可能とする。よって、スフェロプラストがどれほど巨大化できるかは、内部の液胞様構造体をどれほど大きくできるかで決まる。

[1] Takahashi S, Nishida H (2016) Growth of *Enterobacter amnigenus* and *Escherichia coli* spheroplasts in marine broth containing penicillin. Bulletin of Toyama Prefectural University 26, 27-30
[2] Takahashi S, et al. (2016) Comparison of transcriptomes of enlarged spheroplasts of *Erythrobacter litoralis* and *Lelliottia amnigena*. AIMS Microbiology 2, 152-189
[3] Takayanagi A, et al. (2016) Requirement of dark culture condition for enlargement of spheroplasts of the aerobic anoxygenic photosynthetic marine bacterium *Erythrobacter litoralis*. Journal of General and Applied Microbiology 62, 14-17

Bacterial spheroplasts, Cell membrane, Vacuole-like structure

発表責任者：西田洋巳（hnishida@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4SY23-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:20～ A17 会場

大腸菌形態形成制御因子 MreB アクチンと膜タンパク質 RodZ の動態の制御

Regulation of motion of cell shape determinant proteins MreB and RodZ in *Escherichia coli*.

栗田 恵輔[1]、阿合 理沙[1]、加藤 郁也[1]、仁木 宏典[2]、○塩見 大輔[1] ([1]立教大理、[2]遺伝研)
Keisuke Kurita[1], Risa Ago[1], Fumiya Kato[1], Hironori Niki[2], ○Daisuke Shiomi[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Nat. Inst. Gen.)

バクテリアの細胞形態は、細胞膜貫通型タンパク質や膜表在性タンパク質を含む超分子複合体 elongasome によって制御されている。その中でも、MreB アクチンは特に重要で、細胞極性、細胞長、細胞幅など細胞形態の制御全般に関与している。MreB は膜タンパク質 RodZ などによって膜にアンカーされるだけでなく、自身の持つ両親媒性ヘリックにより、直接、細胞膜と相互作用できる。最近、我々は、MreB が細胞極に局在する酸性リン脂質（ホスファチジルグリセロールとカルジオリピン）によって極から排除されることにより、結果的に細胞中央のシリンダー部分にのみ局在することを明らかにした。このような MreB の細胞内局在が、細胞極性や細胞伸長に重要である。さらに、MreB は細胞短軸に沿って回転運動をしていることが知られている。この回転運動は、ペプチドグリカン合成を阻害することによって停止する。ペリプラズムで起こるペプチドグリカン合成がどのようにして細胞質で起こる MreB の回転運動に影響するのだろうか？上述のように、MreB は膜タンパク質 RodZ や PBP2（ペプチドグリカン合成酵素）と相互作用する。これまでに、RodZ タンパク質が MreB とペプチドグリカン合成をリンクすることが報告されている。我々は、RodZ による回転運動の制御を詳細に解析するために、RodZ の膜貫通領域と他のタンパク質と置き換えたキメラタンパク質を作製した。このキメラタンパク質を Δ*rodZ* 株で発現すると、MreB の回転運動が著しく低下した。このことは、RodZ の膜貫通領域が MreB の回転運動に重要な役割を果たすことを示している。さらに、MreB の回転運動の分子機構を明らかにするために、酸性リン脂質欠損株での MreB の動態を調べた。その結果、酸性リン脂質欠損株では MreB の回転が著しく低下した。すなわち、酸性リン脂質が MreB の動態に重要な役割を果たしていることが分かった。以上のように細胞膜と膜タンパク質が、elongasome 複合体の動態に重要な機能を果たすことを明らかにした。

cell shape, MreB, phospholipids

発表責任者：塩見大輔（dshiomi@rikkyo.ac.jp）

講演番号：4SY23-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:50～ A17 会場

腸管出血性大腸菌の外膜小胞 OMVs の産生と抗菌ペプチド耐性
Enterohaemorrhagic *E. coli* utilizes outer membrane vesicles against attack of antimicrobial peptide
○戸邉 亨（大阪大学)
○Toru Tobe (Osaka University)

病原菌が効率的に宿主に感染を成立させるために、自然免疫系による生体防御系に対抗する様々な手段を駆使していることが知られている。抗菌ペプチドに対する抵抗性も、その一つである。腸管出血性大腸菌 EHEC O157 は、腸管環境因子による病原性遺伝子発現の活性化に伴いヒト抗菌ペプチド LL-37 に対する抵抗性が上昇する。これは、外膜タンパク質 OmpT protease に依存している。*ompT* 遺伝子の発現は、病原性の活性化因子により細胞付着などの重要な病原性遺伝子群と協調的に制御され、病原性活性化により発現上昇していた。しかし、菌体における OmpT 活性には、顕著な上昇は認められなかった。一方で、LL-37 抵抗性の上昇は培養上清によることが認められた。OmpT protease の活性には、脂質との結合が必要であることが明らかにされていることから、OmpT が外膜小胞（Outer membrane vesicle: OMV）に搭載され分泌されている可能性が想定された。実際に、病原性活性化に伴い上清中の OMV 画分における OmpT 活性が上昇していた。OmpT は、OMV の産生を正に制御していることが知られているが、EHEC O157 においても、病原性の発現活性化に伴い、OmpT 依存的に OMV の産生量が増大した。さらに、OMV の産生は LL-37 刺激によっても上昇した。これらの結果より、OmpT は、自身を搭載した OMV の産生を活性化し菌体外に分泌させること、また、EHEC は、腸管において病原性が活性化されると OmpT を搭載した OMV の産生を増加させ、LL-37 が菌体に到達する前に分解することで、抵抗性を増大させていると考えられた。

O157, protease, gene regulation

発表責任者：戸邉　亨（torutobe@sahs.med.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4SY23-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:20～ A17 会場

メカノセンシティブチャネルの機能解析と応用

The analysis of mechanosensitive channels and the application

○橋本 賢一[1]、矢部 勇[1]、中山 義敬[2]、Martinac Boris[2]、川崎 寿[1]（[1]東電大院工、[2]Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia）
○Ken-ichi Hashimoto[1], Isamu Yabe[1], Yoshitaka Nakayama[2], Boris Martinac[2], Hisashi Kawasaki[1]（[1]Tokyo Denki Univ., [2]Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia）

全ての細胞は脂質により構成された膜によって生命活動の場を明確に区別している。この膜には生命活動に必須な様々な機能を持つタンパク質が存在している。これらは細胞内外の物質の輸送を司るもの、エネルギーの産生を司るもの、細胞にかかるストレスの緩和を司るものなど、生命活動に欠かすことのできない機能を持つ。

その重要性とは裏腹に、膜タンパク質の機能は未だ不明瞭な点が多く、十分な解析が行われたとは言い難い状況にある。この原因の一つは、膜タンパク質は水溶性タンパク質と比較して機能や構造の解析が困難な点にある。我々は膜を介したイオンの移動を直接電流値として計測することができるパッチクランプ法を用い、電気生理学的手法により膜タンパク質の機能解析を行ってきた。パッチクランプ法はガラス製のピペットを直接細胞膜へアクセスする必要があるため、対象となる細胞はある程度(直径 5μm 程度)以上のサイズのものに限られる。我々は原核細胞にパッチクランプ法を対応できるよう、独自にシステムのアップグレードを行ってきた。このシステムを用い、大腸菌の呼吸鎖末端酸化酵素のプロトン輸送を詳細に解析することに成功した。

さらに我々は工業的グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* のメカノセンシティブチャネル MscCG がグルタミン酸を通過させる担体として機能することを明らかにした。このチャネルはグルタミン酸以外にもアスパラギン酸、フェニルプロピオン酸、リシンも通過させることが明らかとなった。我々は大腸菌を親株としたフェニルアラニン生産菌、リシン生産菌、イノシン酸生産菌にこのチャネルを発現させることで、その生産性が向上することを見出した。この結果は、MscCG は合成生物学的な物質生産手法において、マルチな物質排出担体として利用できることを示唆する。

また、MscCG を含むメカノセンシティブチャネルファミリーは低浸透圧ストレスに対する安全弁として働くと考えられてきたが、*C. glutamicum* においてメカノセンシティブチャネルを欠損するとストレプトマイシン、クロラムフェニコール、カナマイシンに対する感受性が低下することが新たに明らかとなった。別方向からの解析により、*C. glutamicum* はメカノセンシティブチャネルの欠損によって熱ストレスをかけた後の細胞増殖が悪化することも新たに明らかとなった。

これらの結果はメカノセンシティブチャネルの多機能性を示し、より詳細な解析が行われることにより新たな応用利用が可能になると考えられる。

mechanosensitive channel, exporter, importer

発表責任者：川崎　寿（kawasaki@cck.dendai.ac.jp）

講演番号：4SY23-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:40～ A17 会場

Significance of the *Corynebacterium glutamicum* MscCG mechanosensitive channel in fine-tuning of compatible solute accumulation and export

○ Boris Martinac[1,2], Yoshitaka Nakayama[1], Kosuke Komazawa[3], Navid Bavi[1,2], Ken-ichi Hashimoto[3], Hisashi Kawasaki[3] ([1]Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia, [2]St Vincent's Clinical School, University of New South Wales, Sydney, Australia, [3]Tokyo Denki University, Tokyo, Japan)

MscCG mechanosensitive channel of the Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* belongs to the family of bacterial MscS-type mechanosensitive channels. Deletion and complementation studies in *C. glutamicum* showed a significant contribution of the MscCG protein to betaine efflux in response to hypo-osmotic conditions. Also, together with the betaine transporter BetP MscCG constitutes the “pump-and-leak” mechanism in osmoregulation in *C. glutamicum* under hyperosmotic conditions by fine-tuning the steady state concentration of compatible solutes in the cytoplasm. Furthermore, MscCG is a major contributor to glutamate export, which has been used for the industrial production of amino acids. By using the patch-clamp technique we have characterized the MscCG channel activity in giant spheroplast preparations of *E. coli* and *C. glutamicum* by determining the channel activation threshold, ion conductance, rectification and gating kinetics. We have also found that *C. glutamicum* cell membrane is much softer than the *E. coli* membrane using the micropipette aspiration technique and determined that mechanical properties of the membrane significantly affected the gating of MscCG. These results have potential implications for optimizing industrial production of amino acids.

Supported by the Australian Research Council.

mechanosensitive channel, MscCG, *Corynebacterium glutamicum*

発表責任者：川崎　寿（kawasaki@cck.dendai.ac.jp）

講演番号：4SY24-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A18 会場

ミクロオートファジーの分子機構、生理機能の多様性

Diversity of molecular mechanisms and physiological functions of microautophagy

○奥 公秀、阪井 康能（京都大農）
○Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

オートファジーは、細胞質成分やオルガネラを液胞（リソソーム）へ輸送し分解する過程の総称であり、その様式・分子機構として多様なものが存在する。近年の研究から、脂質２重膜構造体を形成して輸送対象を取り囲む様式のオートファジーである、マクロオートファジーの分子機構および生理機能の解明が進展した。これまで同定されたオートファジー関連遺伝子群(Autophagy-related genes、ATG 遺伝子と略)の核となるものは、この脂質２重膜構造体形成に機能するタンパク質をコードする。一方で、液胞・リソソーム膜が直接変形し分解対象を取り囲む様式のオートファジーである、ミクロオートファジーについては、その存在は明示されているものの、分子機構については不明な点が多く残されている。

本発表者らは複数種の酵母を用いて、ミクロオートファジーの分子機構の解明に取り組んできた。結果、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii*（*Pichia pastoris*）のペルオキシソームを分解対象としたミクロオートファジー（ミクロペキソファジー）に多数の ATG 遺伝子群が機能することを見出した。形態学的解析から、ペルオキシソームを取り囲む液胞膜伸長部の先端同士を橋渡しする、新規の脂質２重膜構造体の形成が見られたことから、ミクロペキソファジー時の ATG 遺伝子群の機能は、マクロオートファジー同様、この新規膜構造体の形成に働くことが分かった。一方で本発表者らは最近、*Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究から、上記の脂質２重膜構造体形成に機能する ATG 遺伝子を全く必要としない、新たなミクロオートファジーの分子機構を見出した。この場合は、通常エンドソームにおいて多胞体（Multivesicular body）形成に働く ESCRT タンパク質群が重要な働きをすることが見出された。

以上の研究成果を、酵母以外の生物種を用いた他の研究結果とも照らし合わせ、本シンポジウムではミクロオートファジーの分子機構、生理機能の多様性を包括的に紹介したい。

autophagy, microautophagy, vacuole

発表責任者：奥　公秀（oku.masahide.6a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY24-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A18 会場

オートファジーによる鉄イオンのリサイクリング
Recycling of iron via the bulk autophagy in the budding yeast
○堀江 哲郎[1]、堀江（川俣） 朋子[2]、大隅 良典[2] ([1]日歯大・生命歯、[2]東工大・科技創院)
○Tetsuro Horie[1], Tomoko Horie (Kawamata)[2], Yoshinori Ohsumi[2] ([1]The Nippon Dental Univ., [2]Tokyo Inst. of Tech.)

オートファジーは細胞質の大規模な分解システムであり、タンパク質分子のみならず、時にはオルガネラ全体を取り込み、液胞（リソソーム）中の加水分解酵素群により分解する。出芽酵母(*S. cerevisiae*)においてオートファジーは窒素飢餓により誘導され、タンパク質を分解し、生存に必要なアミノ酸プールを供することがよく知られているが[1]、オートファジーは窒素飢餓のみならず、炭素源や硫黄飢餓など様々な栄養飢餓で誘導されること[2]や、その分解により生じる産物が多彩であることから、その代謝における影響の全貌はいまだ明らかとなっていない。

本来、出芽酵母は自然界において栄養条件の厳しい果実や樹木の表面に生息するが、オートファジー研究では、富栄養培地で生育させた細胞を窒素源のない最少培地に移してオートファジーを誘導するという方法がよく用いられてきた。これはこの条件がオートファジーを明確に誘導するからであるが、本来の生理的機能を明らかとすることはできない。そこで我々はオートファジーの生理的役割について再検討するために、酵母の生育環境に近い栄養の乏しい最少培地を用い、また代謝への影響を避けるために、マーカー遺伝子であるアミノ酸や核酸の栄養要求性を持たない酵母を用いた独自の実験系を用いてオートファジーの生理的機能について詳細な研究を行ってきた。

その結果、我々はオートファジー欠損株(以後 *atg* 欠損株)が最少培地で増殖中にダイオキシックシフト不全を示すことを見出した。その時さらに１）呼吸活性の低下、2）細胞内アミノ酸含量の低下や 3）レドックスバランスの異常が生じていたことから、オートファジーが細胞のホメオスタシスの維持に重要な働きを担っていることが強く示唆された。また *atg* 欠損株のダイオキシックシフト不全は富栄養培地中では見られなかったことから、最少培地中のなんらかの成分不足が原因であると予想された。そこでダイオキシックシフト不全を回復する培地成分を探索した結果、鉄イオンが顕著にダイオキシックシフト不全を回復することを見出した。本会では栄養の乏しい最少培地で増殖する出芽酵母のオートファジーによる、鉄イオンのリサイクルとダイオキシックシフトの機能関連についての解析結果を紹介し[3]、多岐に渡るオートファジーの生理的役割について議論したい。

1. Onodera, J. and Y. Ohsumi, *J Biol Chem*, 2005. **280**: 31582-6.
2. Noda, T. and Y. Ohsumi, *J Biol Chem*, 1998. **273**: 3963-6.
3. Horie, T., et al., *J Biol Chem*, 2017. **292**: 8533-8543.

autophagy, trace metal, yeast

発表責任者：堀江　哲郎（thorie@tky.ndu.ac.jp）

講演番号：4SY24-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A18 会場

環境に応じた葉緑体分解を担う 2 種のオートファジー経路

Coordination of two types of autophagy for the controlled turnover of chloroplasts

○泉 正範[1,2,3] ([1] 東北大・学際研、[2] 東北大院・生命科学、[3]JST・さきがけ)
○Masanori Izumi[1,2,3] ([1]FRIS, Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ., [3]PRESTO, JST)

葉緑体には、C3 植物の葉で全窒素の約 8 割が分配されるなど多量の栄養素が投資されている。植物は、一度形成した葉の成分を分解し、派生する窒素を成長部位へ転流して再利用する仕組みを有しており、葉緑体の分解はその初発として最も重要な反応である。一方、葉緑体に投資される栄養素の多くが光合成関連タンパク質として存在しており、それらは光合成を行う過程で過剰な太陽光エネルギーによる障害を常に蓄積している。光合成機能を維持するためには、障害を受けた葉緑体成分は適切に除去、分解される必要がある。よって「葉緑体の分解機構」は、作物の栄養利用と光合成機能維持の両面から作物の成長に深く関わる農学上重要な反応である。

我々はこれまでに、真核生物に進化的に保存される細胞内自己分解システム「オートファジー」が葉緑体の分解を担うことを明らかにしてきた。オートファジーは、細胞質の一部を二重膜小胞オートファゴソームで隔離し、液胞へ輸送、分解する機構である。まず、葉緑体ストロマ成分の一部が、小胞 Rubisco-containing body（RCB）としてオートファジーを介して分解される RCB 経路を、シロイヌナズナ及びイネにおいて同定した。RCB 経路は、暗処理など、葉の光合成が阻害される環境で特に活性化した。さらにその細胞内動態を顕微鏡下で観察し、暗処理による炭素欠乏で葉緑体の一部が突出構造を作ること、この構造体がオートファゴソーム膜に取り囲まれることで RCB となり、液胞膜を介して液胞内部へ放出されること、が明らかとなった。オートファジー機能欠損株では、暗処理時の遊離アミノ酸含量の増加が抑制されたことから、RCB 経路は糖飢餓に応じて葉緑体タンパク質を分解し、遊離アミノ酸をエネルギー源として供給する役割を担っていると考えられた。

そしてごく最近我々は、強い可視光や紫外線 B の照射によりシロイヌナズナ葉に障害を与えると、チラコイド膜を含む葉緑体が丸ごと液胞に取り込まれる「クロロファジー」が、RCB 経路の活性化無しに誘導されることを見出した。その誘導時には、葉緑体が丸ごとオートファゴソームで囲まれることはなく、葉緑体が液胞側に移動し液胞膜に直接隔離される過程を経ることで液胞内へ移行する可能性が示された。以上の結果から、2 つのオートファジー経路は、環境応答性と膜動態が異なることが明らかとなり、環境に応じて部分分解と全分解が使い分けられることで葉緑体の適切な分解がなされていることが示唆された。

autophagy, chloroplasts, plants

発表責任者：泉　正範（m-izumi@tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY24-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A18 会場

植物ミクロオートファジー　~液胞内分解系のバックアップシステムとして~
Plant microautophagy as a backup system for vacuolar degradation
○吉本 光希（明治大・農・生命科学）
○Kohki Yoshimoto (Meiji Univ.)

植物におけるオートファジーの存在は非常に古くから提唱されており、動物のそれに後れを取らず、1960 年代後半には電子顕微鏡によってオートファジー関連構造体が植物細胞で観察されている。それらの結果によると、植物には少なくとも 2 つの異なるオートファジー経路が存在する。一つ目はマクロオートファジーで、オートファゴソームと呼ばれる小胞によってオルガネラを含む細胞質成分を液胞に輸送し分解する経路である。二つ目はミクロオートファジーで、液胞膜を陥入させ細胞質成分の一部を液胞内に取り込み分解する経路である。今回、シロイヌナズナの根において、ある特定の栄養条件下でマクロオートファジーが阻害されること、また、その阻害を相補するバックアップシステムとしてミクロオートファジーが誘導されることが明らかになったので報告する。

autophagy, plants, nutrients

発表責任者：吉本　光希（kohki_yoshimoto@meiji.ac.jp）

講演番号：4SY24-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A18 会場

選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物

Targeted degradation of cytosolic materials using selective autophagy

○有本 博一、高橋 大輝、一刀 かおり（東北大院生命科学）
○Hirokazu ARIMOTO, Daiki TAKAHASHI, Kaori ITTO (Tohoku Univ.)

オートファジーは、細胞内分解を通じて恒常性維持に貢献し、癌や神経変性疾患など各種の疾患抑制にも関わっている。このため、オートファジーを創薬に利用しようという機運も高まっている。ここで重要なのは、オートファジー分解の選択性である。生命科学研究のツールや医薬として利用するのであれば、可能な限り目的分子のみを分解することが望ましい。

選択的オートファジーでは、排除対象の周囲に、しばしばユビキチン化が観察される。このためユビキチン化の制御によって、狙った対象を人為分解する手法が期待される。しかしながら、多様性があるユビキチン鎖のなかで、「オートファジー行き」を決定づける鎖のタイプは明らかでなく、そのような特定のユビキチン鎖は存在しないと考えている研究者さえいる。

私たちは、A 群連鎖球菌(GAS)のオートファジー排除の機構を研究するなかで、*S*-グアニル化と呼ばれるタンパク質修飾に着目した[1]。この修飾は、内因性小分子 8-ニトロ cGMP とシステイン残基の反応で生じる[2]。GAS のオートファジー排除において、菌周囲の *S*-グアニル化は極めて重要で、しかも、*S*-グアニル化が細菌の K63 型ユビキチン化を促進することが明らかになっている。

この講演では、*S*-グアニル化に学んだ新規医薬リード化合物を紹介する。この分子は、特定のタンパク質や細胞小器官などを選択的にオートファジー分解することができる。例えば、機能不全ミトコンドリアの分解を促進することによって、細胞死を抑制することも可能である。

1) C. Ito and S. Saito et al., *Mol. Cell* ***52,*** 794 (2013).
2) T. Sawa et al., *Nat. Chem. Biol.* ***3,*** 727 (2007).

autophagy, targeted degradation, small molecule

発表責任者：有本博一（arimoto@tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY25-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:10～ A19 会場

昆虫による植物ホルモン生産とゴール形成
Phytohormone synthesis involved in gall induction by insects

○鈴木 義人 (茨大農)
○Yoshihito Suzuki (Ibaraki Univ.)

一部の植食性昆虫は，植物組織の形状および性状を変化させることにより，住まい兼食料としてゴール（虫えい，虫コブ）と呼ばれる異常組織を形成する。我々はハバチがシバヤナギに形成するゴールを対象に，ゴール形成において植物ホルモンが関与している可能性を検討した。ゴール形成には異常な細胞分裂が伴うことから，オーキシンとサイトカイニンに着目した。また，一般的にゴール組織はアミノ酸等の栄養分に富んでおり，ゴール形成の適応的意義として栄養仮説が広く認められている。この観点からも，栄養分の輸送に必要な維管束の形成にはオーキシンが，また，栄養分を取り込むシンク器官としての機能増進にはサイトカイニンが関与していると考えられた。ハバチは産卵時に卵台液と呼ばれる液体を植物に注入するが，その液体のみでも初期のゴール形成が見られる。また，孵化した幼虫が内部を摂食し始めることによって，さらにゴールが大きく発達し，また幼虫が摂食する内部組織が維持される。分析の結果，卵台液にはリボース結合型サイトカイニン（*t*ZR）が 0.15 mg g^{-1} という極めて高い濃度で含まれており，初期の細胞分裂に関与していると考えられた。また，成長途中のゴール内部のハバチ幼虫には *t*Z が 1.3 μg g^{-1}，IAA（活性型オーキシン）が 1.1 μg g^{-1} で，それぞれシバヤナギの葉の約 1000 倍および 100 倍という高い濃度であった。一方，10 月になるとハバチ幼虫はゴールに孔を空けて脱出するが，その幼虫にはいずれの植物ホルモンもごく低濃度にしか含まれておらず，昆虫に含まれる植物ホルモンとゴールの発達や維持とに相関性が認められた。

ゴール形成昆虫のみならず，ゴール非形成昆虫にもオーキシン生合成能があることから，ゴール形成昆虫は，昆虫がもともと持っていたオーキシン生産能をより効率の高いものへと進化させ，ゴール形成能を獲得したと考えられる。カイコ絹糸腺から調製した酵素液を用いて，昆虫における IAA（活性型オーキシン）の生合成経路を Trp→インドールアセトアルドキシム（IAOx）→インドールアセトアルデヒド（IAAld）→IAA と決定した。この経路はハバチにおいても機能しており，植物や IAA 生産性微生物の経路とは異なるものであった。また，カイコ絹糸腺では上流ほど律速段階になっているが，ハバチでは Trp→IAOx の変換が相対的に強まっていることから，この変換に関して，より効率の良い変換活性を獲得したものと考えられる。

一方，サイトカイニンについては，生合成の鍵酵素であるイソペンテニルトランスフェラーゼ活性がハバチで検出されたが，基質特異性から原核生物型である可能性が高く，共生微生物が関与している可能性が考えられる。

insect gall, phytohormone, biosynthesis

発表責任者：鈴木義人（yoshihito.suzuki.chemeco@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：4SY25-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:40～ A19 会場

昆虫類のステロール生合成の欠損とステロール要求性

The loss of sterol-biosynthesis and the sterol requirements in insects

○永田 晋治（東大院新領域）
○Shinji NAGATA (GSFS, the Univ of Tokyo)

昆虫類は、甲殻類から進化し陸上での繁栄を成功させた。昆虫類が進化の過程で多様化した主要な要因は、翅の獲得、植食性の適応放散、変態(蛹期)の 3 つの獲得形質と考えられる。現在では、陸上の生物種の 7 割以上が昆虫種となるほど大繁栄している。昆虫類の植食性種の適応放散は、植物の多様性との共進化を伴ったため、さらに多様化が進んだ要因ともなった。ところで、昆虫類は他の節足動物と同様、ステロイド骨格を有する化合物(ステロール化合物)を *de novo* で生合成できない。ステロール化合物は細胞の構成脂質であり、ホルモン(脱皮ホルモン・エクジステロイド)の前駆体でもあるため、生命維持には、餌や共生微生物などに由来するステロール化合物を摂取する必要がある。この特徴は、節足動物だけに認められ、ステロール要求性と呼ばれている。本シンポジウムでは、昆虫類のステロール要求性に関して以下の 2 点を発表する。

（1）節足動物のコレステロール生合成の欠損は、これまでスクワレン環化酵素の欠失が原因とされていた。開示されている各生物種のゲノム情報を用いて、スクワレンからコレステロールまでの 13 段階のコレステロール生合成酵素の相同性遺伝子を探索し、進化上の各生物でのステロール生合成能と生合成酵素遺伝子を比較解析した。その結果、一部の軟体動物では、生合成酵素群が部分的に欠損していたため、軟体動物の一部はコレステロール生合成能が欠損していることが分かった。また、昆虫類を含めた節足動物では、コレステロール生合成を担う酵素群のほとんどが欠損していた。このことから、進化上で無脊椎動物が分岐し多様化する過程で、コレステロール生合成能が段階的に欠落していったことが推測された。

（2）ほとんどの植食性昆虫は、植物ステロールから変換したコレステロールを細胞の構成脂質やホルモン前駆体として利用する。この変換は、植食性昆虫で特徴的に見られ、植食性昆虫の生命維持に重要であることが知られている。この、植物ステロールからコレステロールへの変換の際、側鎖の 24 位が脱アルキル化される。この脱アルキル化の反応は、4 段階の酵素反応であることが 1970 年代に Svoboda らにより示されている。つまり、これらの酵素群が植食性昆虫の生命を維持しているともいえる。4 段階の反応のうち最終ステップは、DHCR24 でありデスモステロールからコレステロールに変換する。この酵素は多くの植食性昆虫で認められ、植食性を決定づけていると、考えられた。

insect, sterol-biosynthesis, sterol requirements

講演番号：4SY25-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:10～ A19 会場

アゲハチョウの擬態に関わる色と紋様の進化

Evolution of pigments and pattern formation involved in mimicry of *Papilio* butterflies

○藤原 晴彦（東大院新領域）
○Haruhiko Fujiwara (Univ. Tokyo)

他の生物などに姿・形を似せて捕食者から逃れる「擬態」はさまざまな動物に見られる生存戦略である。特に、毒のある生物に色や紋様を似せて捕食を逃れるベイツ型擬態はダーウィンの時代から着目されてきた。例えば沖縄などに生息するシロオビアゲハは、メスの一部（擬態型）のみが毒蝶のベニモンアゲハに翅の紋様などを似せる一方、非擬態型のメスとオスはそれとは全く異なる紋様をしている。シロオビアゲハのベイツ型擬態の表現形質は 1 遺伝子座 *H* に起因することが知られていたが、その原因遺伝子や紋様形成メカニズムはこれまで不明だった。しかし近年、我々は全ゲノムプロジェクトと分子遺伝学的な解析から、シロオビアゲハの *H* 遺伝子座の原因領域は性分化を制御する転写因子 *doublesex(dsx)*などを含む複数の遺伝子からなる超遺伝子構造をしていることを見出した。擬態型 Dsx の機能をノックダウンすると表現型が擬態型から非擬態型に切り替わるなど遺伝子の機能検証が進む一方で、現象の背景や進化プロセスを深く理解するためには、擬態型、非擬態型の紋様の色素の同定や合成プロセスの理解が必要と考えられた。そこで、シロオビアゲハの擬態型、非擬態型に加えてモデルのベニモンアゲハの翅の各色素の同定を試みるとともに、各色の UV の吸収や反射、光学的性質、電顕レベルでの微細構造の観察を行った。さらに、各色素合成に関与すると予想された遺伝子をノックダウンしてどのような表現型の変化が生じるかを調べている。これらの知見は、モデル種と擬態種の間の収斂進化、ベイツ型擬態の平行進化の背景にある分子機構の解明に役立つと期待される。

pigment, pattern formation, Papilio butterflies

発表責任者：藤原晴彦（haruh@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY25-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:40～ A19 会場

陸上植物における生理活性ジテルペノイドの生合成にみられる機能進化

Functional evolution of diterpenoid biosynthetic enzymes in land plants

○川出 洋[1]、宮崎 翔[2]、林 謙一郎[3]、岡田 憲典[4]、中嶋 正敏[2] ([1]東農工大院農、[2]東大院農生科、[3]岡山理大理、[4]東大生物生産工学)
○ Hiroshi Kawaide[1], Sho Miyazaki[2], Ken-ichiro Hayashi[3], Kazunori Okada[4], Masatoshi Nakajima[2] ([1]Tokyo Univ. Agric. & Technol., [2]Univ. Tokyo, [3]Okayama Univ. Sci., [4]Biotechnol. Center, Univ. Tokyo)

陸上植物における恒常性維持のために機能する植物ホルモン類は，植物種間での成長制御機構の差が幾分見られるものの普遍的に共通の物質が存在しているものと考えられてきた。演者らはコケ植物を用いてジテルペン系植物ホルモンのジベレリン（GA）に関する研究を展開しているが，モデルコケ植物として知られるヒメツリガネゴケ(*Physicomitrella patens*)にはGAが検出されないことがわかった。なおかつ，活性型 GA や GA 生合成阻害剤を投与しても表現型に変化が見られない。ここで演者らは GA とは異なる内因性成長制御物質の存在を原始 GA 型物質の存在を考え，当学会の一般講演でその研究成果を発表してきた。一方，コケ植物が生産する外因性生物活性物質についても同時に研究を進めていると，イネ科植物が生産するファイトアレキシン類の一つ，モミラクトン類（ML）を蘚類ハイゴケ(*Hypnum plumaeforme*)も生産することを見いだした。ML も GA と同様ジテルペン系化合物で，その生合成起源は一部 GA と共通または類似した経路を経る。本シンポジウムでは，陸上植物における GA および ML の骨格構築に関するジテルペン環化酵素を中心に，ジテルペノイド生合成酵素の構造と機能を調べていくことで理解できる進化の軌跡について紹介してみたい。

維管束植物における *ent*-カウレン生合成は，基質ゲラニルゲラニル二リン酸から単機能型の２つの酵素によって２段階の環化反応がそれぞれ触媒されて *ent*-カウレンが合成される。GA を生産する菌類においては多機能型環化酵素として１つの酵素が２段階の環化反応を触媒するが，驚くべきことに蘚類 *P. patens* や *H. plumaeforme* の *ent*-カウレン生合成を調べてみると，陸上植物でありながら菌類と同様の多機能型の環化酵素が *ent*-カウレン生合成に関与している。同様に苔類のツツソロイゴケでも多機能型 *ent*-カウレン合成酵素が機能をしているが，全ゲノムが解明されたゼニゴケでは維管束植物のような単機能型の２つの酵素が *ent*-カウレン合成に関与することが報告された。このように，コケ植物のなかでも蘚類と苔類さらには苔類同士の間で *ent*-カウレン生合成の酵素（機能）の多様性が見られることは，原始 GA 型物質から GA への構造変化と生理機能進化に深く関わっているのかも知れない。さて，*H. plumaeforme* では３つのジテルペン環化酵素が機能しており，１つは ML 生合成に関与する多機能型 *syn*-ピマラジエン合成酵素であった。残りの２つは *ent*-カウレン合成酵素と思われたが，アミノ酸配列レベルで９０％近い相同性を持ちながら *ent*-カウレンと *ent*-ピマラジエンのそれぞれを単一で合成する，機能のまったく異なる環化酵素であった。生成物の厳密な作り別けに関わるアミノ酸の特定をすることで，植物界の *ent*-カウレン合成酵素の機能進化について紹介する。

gibberellin, momilactone, Physcomitrella patens

発表責任者：川出　洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4SY25-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:10～ A19 会場

新世界ザルの嗅覚・味覚受容体とその採食果実の匂い成分を切り口にした霊長類の感覚進化の解明
Olfactory and taste receptor genes of New World monkeys and their dietary fruit odorants
○河村 正二（東京大新領域）
○Shoji Kawamura (Univ. Tokyo)

感覚は動物と外界のインターフェイスとして、食べ物の検出や評価に重要な働きをする。霊長類は、熟した果実を色覚により見分ける典型的な視覚動物と見られてきた。視覚以外の感覚は、霊長類の感覚進化の研究では軽視されてきたといえる。特に嗅覚は、視覚とのトレードオフにより重要性が低下したと考えられてきた。ところが近年、ヒトの嗅覚は従来考えられていたよりずっと優れていることや、色覚タイプの異なる旧世界霊長類（旧世界ザル、類人猿、ヒト）と新世界ザル類の間で、嗅覚受容体(OR)遺伝子数に大きな違いがないことが示され、霊長類の感覚進化の理解は再考を迫られている。新世界ザルは食性や色覚の多様性が顕著であるため、感覚の総体的な進化を理解するのに好適といえる。そこで、新世界ザル全 3 科と多様な色覚型を網羅して、オマキザル（オマキザル亜科：3 アレル 2-3 色型多型色覚)、タマリン（マーモセット亜科：3 アレル 2-3 色型多型色覚)、ヨザル（ヨザル亜科：1 色型色盲)、クモザル（クモザル亜科：2 アレル 2-3 色型多型色覚)、ホエザル（ホエザル亜科：恒常的 3 色型色覚)、ティティ（ティティ亜科：3 アリル 2-3 色型多型色覚）の 6 種を対象に、ターゲットキャプチャーと次世代シークエンシングにより、遺伝子数の膨大な OR に加え、苦味受容体(TAS2Rs)と旨味甘味受容体(TAS1Rs)遺伝子の全レパートリーを調べた。さらに、野生オマキザルの採食果実の匂い成分を測定し、採食シグナルとしての匂いの有効性を検討した。

トレードオフ仮説の予測と異なり、新世界ザルで唯一恒常的 3 色型色覚のホエザルは、他の 2 色型 3 色型多型色覚や 1 色型色盲の種に比べ、OR 偽遺伝子割合は特に高くはなかった。総 OR 遺伝子数や偽遺伝子割合に種間で顕著な違いが見られない一方で、機能遺伝子と偽遺伝子のレパートリー構成は種間で大きく異なっていた。TAS2Rs は中立対照に対して塩基多型度が、特に非同義変異で高い傾向にあり、苦味感覚の多様化進化が示唆された。これら 6 種の新世界ザルで一部の苦味受容体を培養細胞系で再構成したところ、苦味物質に対する反応性に種間で顕著な違いが見られた。一方、TAS1Rs は機能制約が緩んでいる傾向がみられ、タマリンでは旨味受容体 TAS1R1 が偽遺伝子化していた。また、主要な採食果実には、熟度の変化に対し、色よりも匂いの変化がより顕著で、匂いが熟度変化の優れた指標であるものがあることがわかった。これらの結果は、霊長類の進化において、ケミカルセンサー遺伝子群がダイナミックに適応進化をしていること、そして果実の採食判断において匂い嗅ぎが有効なことを支持しており、視覚に劣らず、ケミカルセンスが霊長類の感覚進化において重要であることを物語っていると考えられる。

primates, olfactory receptors, taste receptors

発表責任者：河村正二（kawamura@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY26-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A20 会場

高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内細菌叢変動機構の解析：「胆汁酸仮説」の証明に向けて
Analysis of the mechanism underlying alteration of cecal microbiota composition in rats fed a high-fat diet: Toward verification of the "bile acid hypothesis"
○横田 篤、渡辺 真通、藤田 祐己、吹谷 智（北大院農）
○Atsushi Yokota, Masamichi Watanabe, Yuki Fujita, Satoru Fukiya (Hokkaido Univ.)

肥満に伴う腸内細菌叢の変化が報告されて以来、腸内細菌叢と健康の関係は多くの研究者の関心を集めている。近年は様々な病態発症と菌叢変化の因果関係が盛んに研究されているが、多くは不明のままである。特に高脂肪食摂取に伴う肥満やメタボリックシンドロームの発症と腸内細菌叢の関係解明は重視されているが、現状では菌叢変化の機構さえも不明である。我々はその解明のための作業仮説として胆汁酸の関与を推定した。なぜなら胆汁酸は強い殺菌活性をもち、高脂肪食摂取により分泌量が増大するため、これが菌叢変化の選択圧になると考えたからである。我々はこの「胆汁酸仮説」の証明に取組んでおり、今回はその進捗状況について報告する。

我々はまずラットを用いて胆汁酸が盲腸内細菌叢構成に与える影響を検討し、胆汁酸が腸内細菌叢を制御する宿主因子であることを明らかにした。人や齧歯類に共通して存在する胆汁酸であるコール酸 (CA) を添加した食餌を与えたラットでは、CA が盲腸内細菌により殺菌活性の強いデオキシコール酸 (DCA) に変換されていた。また 16S rRNA 遺伝子の配列情報に基づいた盲腸内細菌叢解析により、配列に基づいた分類の単位である operational taxonomic unit (OTU) の特徴的な変動が観察され、グラム陽性菌 *Firmicutes* 門が有意に増加し、グラム陰性菌 *Bacteroidetes* 門が有意に減少した。興味深いことに、この変化はそれまで報告されていた高脂肪食摂取に伴う菌叢変化と類似していた。

次に、高脂肪食がラット盲腸内の胆汁酸組成と菌叢構成に与える影響を調べた。このため予め、齧歯類に特徴的なムリコール酸 (MCA) を含む多様な胆汁酸分子種の殺菌活性を調べた。その結果、βMCA にも強い殺菌活性を見出し、βMCA が DCA と共に菌叢制御に関わっている可能性が示された。そこで高ラード (HL) 食投与試験を行ったところ、HL 食群では Control 食群と比べて DCA やβMCA を含む総胆汁酸量の増大、それに伴う *Firmicutes* 門の有意な増加と *Bacteroidetes* 門の有意な減少が認められた。また、HL 群において有意に増加あるいは減少する多数の OTU が *Firmicutes* 門あるいは *Bacteroidetes* 門にそれぞれ見出された。それらのいくつかの分離に成功したので、DCA 耐性試験を行った所、*Firmicutes* 門の分離株は *Bacteroidetes* 門の分離株よりも総じて有意に高い耐性を示した。ラット個体別の検討により、全菌叢に占める存在比が総胆汁酸濃度と正または負の相関を示す複数の OTU が見出され、それらの多くは HL 群において有意に増加あるいは減少する OTU に一致した。またそれらのいくつかは、上述の CA 添加食投与試験においても増加あるいは減少する OTU であった。

以上の結果は「胆汁酸仮説」を強く支持するものである。また、これらの成果は、高脂肪食摂取時の病態発症と菌叢変化の因果関係の解明に、今後大きく寄与するものと考えられる。

high-fat diet, gut microbiota, bile acid

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY26-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:33～ A20 会場

大腸菌におけるエネルギー獲得代謝の遷移機構
Molecular basis for energy metabolic state transition in *Escherichia coli*

○田中 寛（東工大研究院）
○Kan Tanaka (Tokyo Inst. Technol.)

代謝とは細胞内における代謝産物間の変換反応の総称であり、エネルギー生産や生合成のような生理機能に対応した”代謝系”として様々な調節を受けている。これら代謝系の動態や調節の研究は従来から盛んに進められてきたが、例えばバクテリアを試験管内で培養するような単純な実験系でも、培地成分はその消費や細胞からの放出により常に変化し、連続的に移り変わる細胞代謝を司る分子機構には不明な点が多い。大腸菌を LB や最小培地で試験管内バッチ培養すると、濁度で観察する限りバクテリアの増殖は滑らかであり、栄養源の枯渇に伴い自然に増殖を停止するように見える。しかし、この際に Vibrio 由来のルシフェラーゼを細胞内でレポーターとして発現させておくと、円滑な増殖の間にもルシフェラーゼ活性の複雑な変動が観察される（Koga et al, *MGG* 2005）。これはルシフェラーゼ活性の強さが細胞内のレドックス状態、すなわちエネルギー代謝の状態を反映しており、細胞代謝の状態が増殖の間にも激しく移り変わっていることを示している。

大腸菌をグルコースとカザミノ酸を含む最小培地で培養し、グルコース枯渇以降、アミノ酸や有機酸へと細胞が利用するエネルギー源が順次切り替わっていくプロセスについて、ルシフェラーゼ活性の変動を指標に観察している。この際に見られる活性変動は、バクテリアが幾つかの安定な代謝状態の間を移行しながら増殖していることを示しており、我々はその遷移機構に関しての遺伝学的な解析を進めてきた（Shimada & Tanaka, *AEM* 2016）。この実験系ではグルコースの枯渇後に Non-glycolytic なエネルギー源への切換えがシームレスに起こり、遺伝子発現レベルでの主要な調節因子である cAMP、CRP は実際にこの切換えに必要である。この他の必要因子として、変異株シリーズを用いた関連因子の検索の結果、アセチル CoA から酢酸へのオーバーフロー経路（Pta 及び AckA）の機能がグルコース枯渇後の TCA 回路の始動に重要であることを見出している。グルコース利用時のオーバーフロー経路の意義については多くの議論があり、プロテオーム維持に関わるコストの最適化からの説明がなされているが（Basan et al, *Nature* 2015）、本研究ではフリーCoA の供給に関わるオーバーフロー代謝の新しい役割を見出したと考えている。本シンポジウムではこの制御の分子機構を中心に、遺伝子発現を介さない代謝制御の可能性についても議論したい。

Energy metabolism, Escherichia coli, State transition

発表責任者：田中　寛（kntanaka@res.titech.ac.jp）

講演番号：4SY26-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:01～ A20 会場

中心代謝経路を制御する mRNA クロストーク

mRNA crosstalk regulates central metabolic pathways

○宮腰 昌利 (秋田県大生資科)
○Masatoshi Miyakoshi (Akita Pref. Univ.)

中心代謝経路は転写制御因子による転写レベルの制御と代謝産物によるアロステリックな制御を受けていることはよく知られているが、他のレベルの制御の存在も示唆されている。原核生物において転写後レベルで遺伝子発現を制御する small RNA（sRNA）は、主に部分的に相補性を持つ mRNA の 5’UTR もしくは CDS と塩基対を形成し、標的 mRNA の安定性や翻訳を抑制もしくは活性化する。sRNA と mRNA の塩基対形成を促進する RNA シャペロンの一つである Hfq は、その作用機構がこれまで詳細に解析され、典型的な sRNA に見られる長い連続した U に結合する生化学的な性質を持つ。このような RNA 構造は内因性転写終結によって形成される mRNA の 3’末端の一部にも見られ、もしその近傍に他の RNA と相補性を持つ RNA 配列があれば、典型的な sRNA と同様の制御能を持つことが予想できる (Miyakoshi et al., 2015 Curr. Opin. Microbiol.)。TCA サイクル酵素群をコードする *sdhCDAB-sucABCD* mRNA の 3’UTR は大腸菌やサルモネラで高く保存され、Hfq と結合することが知られている。*sucD* の 3’UTR と相補的な塩基配列を探索したところ、酢酸キナーゼをコードする *ackA* の 5’UTR に腸内細菌科で高く保存された配列が見出された。染色体上で *sucD* の 3’UTR を削除もしくは点変異を導入することで AckA の発現量が増加したことから、生理学的な条件において実際に *sucD* の 3’UTR は *ackA* の 5’UTR と塩基対形成して翻訳を抑制することが示された。さらに、*sucD* の 3’UTR は *ackA* 以外にも大腸菌では *fdoG*、*katG* を、サルモネラでは *yfbV*、*fumB* を標的 mRNA とすることが明らかになった。以上の結果から、mRNA の 3’UTR が RNA によって構成される制御ネットワークの進化の場となっていることが示唆された。このような転写後レベルの制御能を持つと考えられる 3’UTR は大腸菌やサルモネラだけでも数十種類存在し、今後の機能解析が待たれる。

central metabolism, post-transcriptional regulation, Escherichia coli

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4SY26-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:29～ A20 会場

アーキアにおける ADP 依存型リン酸化酵素が示唆するアーキア代謝の進化

What the ADP-dependent kinases tell us of the evolution of archaeal metabolism

○跡見 晴幸[1,2]、佐藤 喬章[1,2]、金井 保[1,2] ([1]京大院工、[2]JST-CREST)
○Haruyuki Atomi[1,2], Takaaki Sato[1,2], Tamotsu Kanai[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST-CREST)

アーキアは系統学的解析に基づいて 1977 年に Carl Woese らにより提唱され、細菌や真核生物と区別される第三の生物ドメインを構成する。アーキアは超好熱菌、メタン生成菌、好酸性菌、高度好塩菌など数多くの極限環境微生物を含む。アーキアはイソプレノイド型膜脂質を利用することや細菌と同じ原核生物でありながら真核生物型の転写・DNA 複製装置を利用することなど多数の興味深い特徴を有する。我々はいままでにアーキアの代謝やその制御に着目して研究を進め、アーキアの特異な代謝機構の一部を明らかにしてきた。

ここではまず超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の Cys 生合成・Ser 分解に関わる代謝について報告する。種々の遺伝学的解析から *T. kodakarensis* における Cys 生合成が Ser から *O*-phosphoserine を介して進行することが示唆された。そこで ATP から産生する ADP を定量する方法で *T. kodakarensis* の無細胞抽出液中から Ser 依存的な kinase 活性を示すタンパク質の探索を試みた。しかし、ADP の産生ではなく、むしろ Ser 存在下で ADP の減少が観察され、探索しているタンパク質は ADP をリン酸基供与体としている可能性が考えられた。そこで無細胞抽出液中の活性を調べたところ、確かに ADP-dependent serine kinase 活性が検出でき、活性を指標に本タンパク質の精製を進めた。その結果 3 つの候補タンパク質が得られ、これらを LC-MS により同定した。同定された 3 候補の各組換え型タンパク質を作製し、それらの ADP-dependent serine kinase 活性を調べたところ、細胞分裂に関わる chromosome partitioning protein と推定されていたタンパク質が、ADP-dependent Ser kinase（SerK）であることが明らかになった。タンパク質中の Ser をリン酸化するプロテインキナーゼはよく知られているが、SerK は遊離の Ser をリン酸化する新規活性を示した。遺伝学的解析を進めたところ、本酵素は Ser から Cys への変換のみならず、Ser の資化に寄与し得ることが判明した。

SerK の発見により、*T. kodakarensis* における ADP-dependent kinase が 4 種（ADP-dependent glucokinase, phosphofructokinase, ribose-1-phosphate kinase, serine kinase）となった。これら酵素の分布を調べると ADP に依存した酵素の存在は Euryarchaeota の根に近い methanogen, Thermococcales, Archaeoglobales に限定されていることが示唆され、他のアーキアにおいては代わりに ATP-dependent kinase が存在する場合があることが判明した。Thermococcales における ADP-dependent kinase が触媒する反応の生理的意義に基づいてアーキアにおける代謝の進化について議論したい。

Archaea, kinase, metabolism

講演番号：4SY26-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:57～ A20 会場

メタボロミクスの精密表現型解析への応用

Application of metabolomics for high resolution phenotype analysis

○福崎 英一郎（大阪大学院工）
○Eiichiro Fukusaki (Osaka Univ.)

生体内に含まれる代謝物の網羅的プロファイルであるメタボローム情報を説明変数としてより下流のマクロ表現型を定量的に解析するメタボリックフィンガープリンティングは，遺伝型の差異を解析できるだけでなく，生体のダイナミックな変動の表現方法として期待できる．メタボリックフィンガープリンティング解析は他のオーム情報（ゲノム，トランスクリプトーム，プロテオーム他）を必要としないことも大きな特長である．運用の例を挙げると，例えば，実験動物の発生段階はメタボロームを説明変数として正確に予測することができる．我々はこれまで，ゼブラフィッシュ，線虫，ショウジョウバエ等を実験材料として初期発生胚の発声段階を正確に予測することに成功している．さらに発生段階に重要な役割を担うバイオマーカー探索への可能性を提示している．発生段階をモニタリングできるという性能は，臨床検体（血液，尿等）をサンプルとして疾患の種類と病状レベルを推定することにもつながる．当該技術は疾患バイオマーカー探索や，疾患の早期診断システム開発への応用も期待できる．メタボリックフィンガープリンティングの技術の応用範囲は広く，複数の遺伝子が関与する複雑な定量的表現型の解析にも応用可能である．さらに，メタボリックフィンガープリンティングは，運用対象は生体に限定されない．当該手法を食品に適用することにより，これまで困難だった複雑な食品機能の記述が可能となり種々の応用展開が期待できる．食品は，多成分から構成される多機能コモディティであり，どの成分がどの機能に関与しているかを限定することは極めて困難である．関与化合物間に相乗効果が存在することから，現在の解析技術では全容解明は至難と言わざるを得ない．これは，近代科学の常とう手段である要素還元科学の適用が必ずしも有効ではないことを示している．一般にはボトムアップの要素還元科学的アプローチで特定された成分によって食品の機能が再構成されることは稀であり，要素還元科学に依らないトップダウンアプローチが求められることは自明である．メタボロームを説明変数とすることにより，従来のケモメトリクスの手法で達成されるパターン認識による食品機能評価値の回帰予測は当然のことながら，加えて，多変量解析により食品機能と食品成分の間の相関が可視化できる可能性がある．当該相関情報の有効活用はひいては，食品産業における生産，収穫後処理，加工，保管，流通のすべてのプロセスの最適化に資する知見が得られることが期待できる．本講演では，多岐にわたるメタボロームの応用例を紹介するとともに，今後の新たな運用に関しても議論したい．

metabolomics, metabolic profiling, metabolic engineering

発表責任者：福崎英一郎（fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4SY26-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:25～ A20 会場

ゲノム合成と起動を実践する「枯草菌」シナリオ

Bacillus subtilis based genome synthesis and restart

○板谷 光泰（慶應大学先端生命研）
○Mitsuhiro Itaya (Inst. Advanced Biosciences)

研究、産業に有用な微生物株を作製するために、ゲノムを大規模に設計して合成する技術を提案、実践している。微生物ゲノムは数百から数千の遺伝子を含む長鎖 DNA で、生体分子としては巨大分子であり、溶液中では擦り切れ易く、ゲノムを無傷で細胞外に取り出す技術は極めて限られる。我々は枯草菌ゲノム中で多数の DNA を連結する画期的な手法を開発して、ラン藻ゲノム（3.5 Mbp）が枯草菌ゲノム（4.2 Mbp）と連結したキメラゲノム株を世界で初めて構築した。
このキメラゲノム株は枯草菌の培地(LB)では問題なく生育するが、ラン藻の培地（BG11）ではまだ生育しない。我々は枯草菌で合成されるゲノムを再起動させるためのいくつかのシナリオを持っており、このトップダウン的手法の取り組みのいくつかと最近の実施例を紹介したい。
これらは前例が全くない取り組みなので試行錯誤の貯まり場のような状況ではあるが、再起動が POC としてブレイクすれば、新規ゲノムを設計し、完全合成して、研究、産業に有用な微生物株を構築する目的に近づけると期待している。またそこに至る我々の研究手法自体が微生物種の違いの本質に迫る実験的手法だと考えており、ゲノムを一から設計（デザイン）する合成生物学の究極のテーマを実践できる汎用的手法となるべく精進している。

Bacillus subtilis genome vector, Genome synthesis, Chassis for genomes

発表責任者：板谷光泰（mita2001@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：4SY27-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A21 会場

streptothricin 類縁抗生物質の生合成酵素群に見出した新規 tRNA 依存型アミド合成酵素

tRNA-dependent amide bond-forming enzyme involved in the biosynthesis of a streptothricin-related compound.

○丸山 千登勢、濱野 吉十 (福井県立大学)
○Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ.)

放線菌が生産する抗生物質 streptothricin（ST）およびその類縁化合物は、共通骨格である streptothrisamine 構造に β-Lys 側鎖または Gly 側鎖を持つことによって、強力な抗菌活性を示す。これらアミノ酸側鎖構造の生合成研究は、β-Lys や Gly に次ぐ、第 3 のアミノ酸側鎖を有する新規 ST 類縁化合物の創製に応用できる。これまでに我々は、ST 類縁化合物の β-Lys 側鎖が非リボソーム型ペプチド合成酵素によって生合成されることを明らかにする一方（*Nature Chem. Biol.*, 8, 791, 2012）、Gly 側鎖は、一次代謝であるタンパク質翻訳システムからハイジャックしたアミノアシル-tRNA^{アミノ酸}(aa-tRNA^{aa})を基質とする新規アミド合成酵素 Orf11 によって生合成されることを見出した（*Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640, 2016）。タンパク質翻訳システムには、Gly-tRNA^{Gly} 以外に 19 種の aa-tRNA^{aa} が存在するため、それらを基質として認識する Orf11 ホモログ酵素を見出すことができれば、新規アミノ酸側鎖を有する ST 類縁化合物の創製が可能であると考えた。

そこで、放線菌ゲノムデータベースより Orf11 ホモログ酵素遺伝子を探索したところ、４つのホモログ酵素遺伝子を新たに見出した。これらの組換え酵素と大腸菌由来の tRNA を用いて酵素反応を行った結果、その 1 つである Sba18 は、期待通り、Gly-tRNA^{Gly} だけでなく Ala-tRNA^{Ala} および Ser-tRNA^{Ser} を基質として認識することが判明し、その酵素反応によって、Ala、Ser 側鎖を持った新規 ST 類縁化合物の生産が観察された。Sba18 は、aa-tRNA^{aa} 上のアミノアシル基だけでなく、tRNA 分子の塩基配列や化学修飾の違いも認識していることが示唆されたことから、tRNA 分子の基質認識機構を明らかにするために、*in vitro* 転写反応により人工合成した tRNA 分子を基質とした酵素反応を行った。さらに、tRNA の 3′末端に様々なアシル基を結合できる人工 RNA 触媒 flexizyme を用い、tRNA に結合しているアシル基に対する基質特異性を検証した。本講演では、tRNA 依存型アミド合成酵素における tRNA 基質の認識機構、および本酵素を利用した新規 ST 類縁化合物の創製について紹介する。

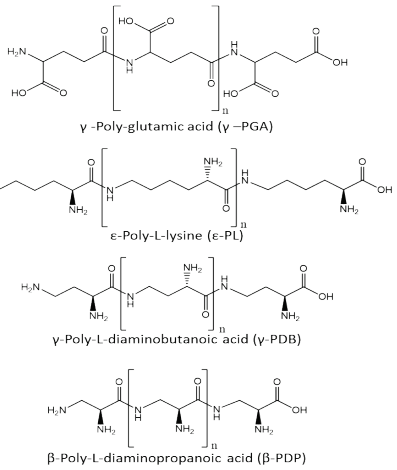
tRNA, peptide, biosynthesis

講演番号：4SY27-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:40～ A21 会場

直鎖状ホモポリアミノ酸を合成する膜結合型 NRPS 様ペプチド合成酵素

Membrane-bound NRPS-like peptide synthetases producing linear homo poly-amino acids

○山中 一也[1]、老川 典夫[1]、濱野 吉十[2] ([1]関西大化生工、[2]福井県大生物資源)
○Kazuya Yamanaka[1], Tadao Oikawa[1], Yoshimitsu Hamano[2] ([1]Kansai Univ., [2]Fukui Prefectural Univ.)



これまでに天然から見出される“ホモ”ポリアミノ酸としては、*Bacillus* 属細菌が生産するɣ-poly-glutamic acid (ɣ-PGA)と数種の *Streptomyces* 属放線菌が生産するε-poly-L-lysine (ε-PL)、β-poly-L-diaminopropionic acid (β-PDP)及びɣ-poly-L-diaminobutyric acid (ɣ-PDB)が知られている。後 3 者は、何れも水溶液中では側鎖アミノ基に由来する正電荷により、ポリカチオンとしての強力な抗菌活性や膜透過性など様々な生理学的性質を示すことから、医療・ライフサイエンス分野への応用利用も期待されている。一方、それらの生合成に目を向けると、何れのポリアミノ酸も鎖長分布を有する特徴的なイソペプチド構造であることから、リボソーム非依存的、すなわち酵素的に生合成されることは容易に推測できる。これらの合成を触媒する酵素(遺伝子)は、新規生理活性バイオポリマーの創製を目指した生合成工学へも利用できる期待度の高い素材であると考えられ、更に微生物二次代謝産物の生合成研究や酵素科学的研究の観点からも大変興味深い。このような背景下、我々は放線菌 *Streptomyces albulus* からε-PL 合成酵素の精製およびその遺伝子の取得に成功し、ε-PL が新奇ドメイン構造を有する細胞膜結合型の NRPS 様ペプチド合成酵素(Pls)により生合成されることを世界に先駆けて明らかにした。この Pls が触媒するペプチド結合形成反応においては、従来型 NRPS の様な鎖長制御機構は無く、ペプチド鎖の伸長がアミノ酸リガーゼの縮合反応と同じく酵素と基質が非共有結合状態で繰り返し進行するため、鎖長の多様性を有するε-PL が生成する。近年になり、この知見を足掛かりとしてβ-PDP も膜結合型 NRPS 様ペプチド合成酵素により生合成されることが明らかにされた。また、ɣ-PDB についても生産菌ゲノムにホモログ遺伝子が見出されることから同様に生合成されるものと推定できる。このことから、Pls 様のペプチド合成酵素はジアミノ酸を構成単位とする多様なホモポリアミノ酸合成酵素として広く微生物に分布しているものと考えられる。実際、微生物ゲノムデータベースに見いだされる Pls 様のペプチド合成酵素の多くは *in silico* 基質特異性予測から、“想像以上に多様な”ホモポリアミノ酸を生合成している可能性を示している。最近、我々はこの知見に基づいたゲノムマイニングによる新規ポリアミノ酸探索を進めており、これまでに天然物としては稀なD体の 2,4-diaminobutyric acid のみから成るホモポリアミノ酸と、更にもう一種の新規カチオン性ホモポリアミノ酸を見出している。本講演では Pls のユニークなペプチド結合形成機構及び微生物ゲノム情報に基づいた新規ポリアミノ酸探索を含む最近の研究成果についても紹介する。

poly-amino acid, non-ribosomal peptide synthetase, genome mining

発表責任者：山中　一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：4SY27-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:15～ A21 会場

中分子創薬に向けた RiPPs 型生合成機構による迅速多様な修飾ペプチド創製手法

Enzymatic synthesis of diverse ribosomally synthesized and post-translationally-modified peptides.

○尾仲 宏康（東大院農）
○Hiroyasu Onaka (Univ. of Tokyo)

中分子創薬という言葉が最近よく聞かれるようになってきた。中分子とは低分子合成薬剤と抗体などの高分子との中間に位置する中程度の分子量(分子量 500～2000)を持つ化合物群であり、ペプチドなどの天然化合物などが含まれる。抗体のような特異的なターゲット認識を持ちつつ、低分子並の安価な製造が可能であるため、次世代創薬に適した化合物群として期待されている。本講演では、そのような中分子の一つである、リボゾーム翻訳後修飾ペプチド(RiPPs: Ribosomally synthesized and post-translatinally modified peptides)に焦点を当てる。RiPPs はその前駆体ペプチドが構造遺伝子としてゲノム上にコードされており、転写翻訳されることによって前駆体ペプチドが形成される。そのため、構造遺伝子の塩基置換によって容易に多様なアナログ体を創製することができる利点があり、創薬における誘導体展開に有利である。今回、この RiPPs 生合成マシナリーの全工程を試験管内にて完全再構成し、遺伝子断片の投入だけで、迅速簡便に多様な修飾ペプチドを作製することが可能になったことについて紹介する。

RiPPs の一種であるゴードスポリン(goadsporin)は放線菌 *Streptomyces* sp. Tp-A0584 が生産する二次代謝産物であり、放線菌に対して二次代謝と形態分化を誘導する活性を有している。ゴードスポリンは 6 カ所のアゾール環部位と 2 カ所のデヒドロアラニン(Dha)部位、N 末にアセチル基を有しており、これらは構造遺伝子である *godA* がリボゾーム翻訳によって GodA 前駆体ペプチドになった後に、6 個の翻訳後修飾酵素群によって導入される。

今回、これら 6 個の酵素を大腸菌組換えタンパク質として調整し無細胞翻訳系と組み合わせることにより、構造遺伝子にプロモータ領域を連結した 200 bp 程度の DNA 断片を投入するだけでワンポット反応によりゴードスポリンが一昼夜で合成できるシステム FIT-GS system を構築した。本システムを用いれば、多様なゴードスポリンアナログを創製することができ、これまでに 53 種類のアナログ体の創製に成功している。

無細胞翻訳系と生合成酵素を用いる本法により、各生合成酵素の精密な基質特異性解析が実現したため、創薬へ向けた効率的なアナログライブラリー創製が今後、より一層期待できる。

T. Ozaki, K et al., ***Nature communications,*** 14207 (2017)

in vitro cell free translation, Middle-size biomolecule, antiiotics

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY27-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:50～ A21 会場

糸状菌由来リボソーマルペプチド RiPPS の生合成機構
Biosynthetic mechanism of fungal ribosomal peptides RiPPS

○及川 英秋、南 篤志、尾崎 太郎（北大院理）
○Hideaki Oikawa, Atsushi Minami, Taro Ozaki (Hokkaido Univ.)

臨床薬 thiostrepton など細菌由来のリボソーマルペプチド（RiPP）の最初の生合成経路は、1980 年代後半に明らかにされたが、これまで糸状菌の RiPP の生合成遺伝子は報告されていなかった。例外的に有名なキノコ毒であるアマニチンが、前駆体ペプチドとプロテアーゼによる環化など細菌類似の経路で生合成が知られていたが、最近、産総研の梅村らが子嚢菌で見出した RiPP の生合成遺伝子クラスターは [1]、多くの点で従来の細菌由来 RiPP のクラスターとは異なっていた。

彼らが *Aspergillus flavus* で見つけた RiPP のクラスターは、遺伝子破壊実験から既知化合物である ustiloxin を生産するためのものであった。我々は破壊株由来の化合物や遺伝子情報から、反復配列を持つ前駆体タンパク UstA と芳香環水酸化酵素 UstQ、さらにこれまで機能解析例がない未知モチーフ DUF3328 を持つ膜タンパク UstYaYb が関与する経路を推定した。そこでこれら４種の遺伝子を導入した麹菌の異種発現株を調製し、これが RiPP のコア構造である ustiloxin F のデメチル体を生産したことから、最初の環化反応は３種の酸化酵素 UstQYaYb が触媒することを突き止めた。さらに in vitro 実験を繰り返して、４種の酵素遺伝子が関与するユニークな側鎖導入機構も解明することができた [2]。

データベースには反復配列を持つ前駆体タンパクと３種の酸化酵素 UstQYaYb ホモログが関与する生合成遺伝子クラスターが相当数あることから、UstQYaYb と機能未知の前駆体タンパクの組み合わせで異種発現したところ、相当する新規環状ペプチドが合成されることを明らかにするとともに、この発現系の有用性が確認できた。

その後、糸状菌ゲノム上で反復配列を持つ前駆体タンパクと新規の酸化的環化酵素 UstY ホモログを持つシンプルな遺伝子クラスターが多数見つかり、中には *Aspergillus niger* のように９種持つものもあった [3]。そこでその代表例である asperipin-2a の異種発現を検討した。その結果 UstY ホモログが芳香環とアミノ酸のβ位での二回の酸化的環化を触媒し、大環状ペプチドを生産した。

本研究を通して、我々は糸状菌で見つかった RiPP が特徴的な前駆体タンパクと新規の酸化酵素によって生合成されることを解明した。本講演では、糸状菌が従来とは全く異なる生合成機構で生産される RiPPs を多数持つ意義、そして RiPPs の真の機能について考察したい。

1) Y. Ye et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, *55*, 8072 –8075；
2) M. Umemura et al. *Fungal Genet. Biol*. **2014**, *68*, 23 – 30;
3) N. Nagano et al., *Fungal Genet. Biol*. **2016**, *86*, 58 – 70.

fungal metabolite, biosynthesis, ribosomal peptide

発表責任者：及川 英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY27-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:25～ A21 会場

カルボニルメチレン構造を有するシュードトリペプチド（Ketomemicin）の生合成機構

Biosynthesis of pseudotripeptide, ketomemicin with carbonylmethylene structure

○大利 徹（北大院工）
○Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

ペプチド結合の形成には多様な酵素が用いられる。その一つに ATP-grasp ligase と総称される酵素群がある。本酵素の最初の例は、田畑らによる *Bacillus subtilis* の YwfE が L-Ala のカルボキシ末端を ATP を用いてリン酸化し、次いで L-Glu のアミノ基が求核剤となりジペプチド L-Ala-L-Glu が生成した報告である [1]。その後、数十例の報告があるが、その多くはアミノ酸類を求核剤に用いる酵素である。

筆者らは、放線菌が生産するペプチド系抗生物質である Pheganomycin の生合成研究を通して、ペプチドを求核剤に用いる ATP-grasp ligase （PGM1）を見出した。本酵素はフェニルグリシン誘導体のカルボキシ末端をリン酸化した後、リボソームで供給される NVKDR または NVKDGPT を求核剤に用いアミド結合を形成する [2]。PGM1 相同遺伝子は一部の放線菌に存在し、何れも共通の 6 つの遺伝子とクラスターを成していた。そこで個々のクラスターを異種放線菌で発現させた結果、何れもペプチド結合がカルボニルメチレン構造に置き換わったシュードジペプチド構造を持ち、その *N* 末にアミジノアミノ酸がアミド結合した化合物が生産され、Ketomemicin と命名した [3]。次に、PGM1 オーソログ（KtmD）の組換え酵素、L-アミジノアルギニン、（シュード）ジペプチドを用いて ATP 存在下で反応を行った結果、両基質間でアミド結合が形成された。したがって本酵素は、ジペプチドを求核剤に用いる ATP-grasp ligase であることがわかった。また，その *N* 末基質は 2 分子の L-Arg からアミジノ基転移酵素（KtmE）により生成することも明らかにした。

これまでカルボニルメチレン構造の生合成に関する報告はないことから解明を試みた。クラスター内の残る 4 つの遺伝子が関与すると予想されたことから組換え酵素を用いて解析を行った。初発反応を担うと予想したアルドラーゼ様の酵素（KtmA）を検討した結果、マロニル CoA とフェニルピルビン酸からベンジルリンゴ酸 CoA が生成する反応を触媒した。続いて脱水酵素（KtmC）をアルドラーゼ生成物と反応させたところ、ベンジルフマル酸 CoA へと変換された。さらに、ピリドキサールリン酸依存酵素であるα-オキソアミン合成酵素（KtmB）が 2 回目の炭素-炭素結合形成を触媒し、最後に還元酵素（KtmF）により二重結合が還元されカルボニルメチレン構造を持つシュードジペプチドが生成することを明らかにした [4]。

[1] ***J. Bacteriol***. **187**, 5195 (2005), [2] ***Nat. Chem. Biol***., **11**, 71 (2015), [3] ***ACS Chem. Biol***., **11**, 1686 (2016), [4] ***Angew. Chem. Int. Ed***. 56, 2026 (2017).

ATP-grasp ligase, pseudopeptide, carbonylmethylene structure

発表責任者：大利　徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY28-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ A22 会場

天然物の科学：ケミカルバイオロジーと Chemistry&Biology
Natural Products Science: Chemical biology and Chemistry&Biology
○上田 実（東北大理）
○Minoru UEDA (Tohoku Univ.)

天然物の化学的研究やそれを用いるケミカルバイオロジー研究は、近年大きく発展した研究分野である。かつては、天然物のもつユニークな構造とその合成が研究の中心であったが、最近は天然物のユニークな生物活性を利用する研究が盛んである。本講演では、植物ホルモン類似天然物コロナチンをツールとして、その生物活性を人工的にチューニングするという化学生物学的研究、および、植物の就眠運動という生物現象に着目し、天然物有機化学と生物学の２つの方向から解明していく Chmistry&Biology の２つの研究例について紹介する。

植物毒素として知られるコロナチンは、植物ホルモン ジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）の構造的ミミックである。コロナチンは、JA-Ile と同じく COI1-JAZ 共受容体のリガンドとして働き、微生物や食草性昆虫による攻撃を受けた際の防御応答反応や植物の生長阻害などの多様な応答を引き起こす。この多様な生物活性は、コロナチンや JA-Ile が、植物体内の多数の COI1-JAZ ホモログに非選択的に結合するためと考えられている。生長阻害を伴わず防御応答のみを活性化できれば、理想的な植物化学防御が可能となるため、多くの研究者が努力を続けていた。我々は、コロナチンの立体異性体をベースとした論理的分子設計指針に基づき、特定の COI1-JAZ 共受容体ホモログに選択的に結合するアゴニストを開発し、これが、植物生長抑制作用を伴うことなく微生物感染防御のみを選択的に活性化することを見いだした。

昨年度のノーベル生理学医学賞の受賞対象となった生物時計は、マメ科植物の就眠運動から発見された（ノーベル財団 HP でも紹介されている）。就眠運動は、進化論のダーウィン以来、多くの研究者の研究意欲を刺激したが、未だその機構は未解明である。我々は、マメ科植物就眠運動を引き起こす内因性化学物質を発見したが、その作用機構解明には、未だ未解明な就眠運動の molecular player の解明が不可欠であった。我々は、就眠運動研究に古くから使われるマメ科植物アメリカネムノキ（*Samanea saman*）を生物材料として、就眠運動に関与するイオンチャネルを全て同定した。これらのイオンチャネルの発現が朝方にのみ活性化され、葉の上面側と下面側の細胞で時計遺伝子によるイオンチャネル発現制御パターンに差があることが分かり、就眠運動が起こる分子機構を解明することができた。また、これによって、化学物質の作用機構解明にも大きなヒントが得られた。Chmistry&Biology の２つのアプローチでひとつの生物現象を研究する面白さについて紹介したい。

coronatine, jasmonates, nyctinasty

発表責任者：上田　実（ueda@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY28-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A22 会場

アミロイドβの毒性オリゴマーの構造解析に基づくアルツハイマー病の早期診断法の開発

Development of the early diagnostic method of Alzheimer's disease based on the structural analysis of the toxic oligomers of amyloid beta

○入江 一浩（京大院農）
○Kazuhiro Irie (Kyoto Univ.)

アルツハイマー病 (AD) の原因物質であるアミロイド β タンパク質 (Aβ) は，凝集（オリゴマー化）することによって神経細胞毒性を示す．近年，Aβ の高分子凝集体（フィブリル）よりも，凝集中間体である可溶性オリゴマーが毒性本体と考えられているがその実態は不明な点が多い．我々は，毒性ならびに凝集能の高い 42 残基の Aβ の系統的なプロリン置換法及び固体 NMR 法による解析から，中央部分 (Glu22, Asp23) でのターン構造（毒性ターン）と C 末端の疎水性コアを特徴とした毒性 2 量体モデルを提唱した [1]．我々はまず，この 2 量体モデルの合成を試みた．毒性ターンを形成しやすい E22P 変異体を用いて, 凝集体中で分子間平行 β シート形成領域にある Ala30 を, L,L-2,6-ジアミノピメリン酸 (DAP) あるいは L,L-2,8-ジアミノアゼライン酸 (DAZ) で置換した，E22P-A30DAP-Aβ40 dimer (**1**) 及び E22P-A30DAZ-Aβ40 dimer (**2**) を固相合成した．さらに，凝集において重要な C 末端の疎水性コア内を DAP で架橋した E22P-G38DAP-Aβ40 dimer (**3**) と対応する Aβ42 の 2 量体モデルである E22P-V40DAP-Aβ42 dimer (**4**) も合成し，これらの構造機能解析を行った [2,3].

Ala30 で架橋した Aβ40 の 2 量体モデル (**1**, **2**) はいずれもフィブリルを形成せず，24 時間以上に渡り準安定なオリゴマーとして存在したが，SH-SY5Y 細胞に対する毒性をほとんど示さなかった．一方，**3** 及び **4** はそれぞれのモノマー (E22P-Aβ40, E22P-Aβ42) に匹敵する高い細胞毒性を示した．さらに，イオンモビリティー質量分析法 (IM-MS) による解析から，**3** 及び **4** は溶解 2～4 時間後に 12～24 量体を形成し，それらは少なくとも 24 時間後まで安定に存在することが明らかになった．それに対して, **1** 及び **2** は, **3** 及び **4** と比べて，より小さなオリゴマー（2～12 量体）の形成に留まった．なお，E22P-Aβ40 および E22P-Aβ42 の凝集速度はきわめて速く，IM-MS によって準安定なオリゴマーを検出できなかった. 以上の結果より, Aβ の毒性発現には C 末端の疎水性コアの形成が重要であり，12～24 量体のオリゴマーが毒性本体であることが示唆された.

最近，これらの毒性 2 量体モデルを選択的に認識する抗体・24B3 の開発に成功した [3,4]. 24B3 抗体は, 溶解直後の野生型 Aβ にはほとんど反応しなかったが, 凝集が進むにつれて反応性が増大した．そこで，24B3 抗体と Aβ の N 末端抗体 (82E1) を組み合わせたサンドイッチ ELISA を開発し，ヒト脳脊髄液を解析した. その結果, AD 患者における毒性オリゴマー量の全 Aβ42 量に対する割合が, AD ではない人に比べて有意に高いことが明らかになった [3,4]．一方で, AD 診断のバイオマーカーの一つである全 Aβ42 の量は，AD 患者において低い傾向が認められたものの有意差はなかった．さらに AD モデルマウスを用いた 24B3 抗体によるワクチン治療の結果についても述べる [5].

【参考文献】 1) K. Murakami *et al., J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15168-15174 (2005); Y. Masuda *et al., ChemBioChem,* **10**, 287-295 (2009), 2) Y. Irie *et al., ACS Chem. Neurosci.*, **8**, 807-816 (2017), 3) K. Murakami *et al., Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016), 4) 入江一浩, *化学*, **71**, 41-44 (2016), 5) N. Izuo *et al., Sci. Rep.* **7**, 11811 (2017).

Amyloid beta, Alzheimer's disease, oligomer

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY28-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ A22 会場

生物活性物質のケミカルスペース拡充戦略：微生物複合培養法及び precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS)法

Expansion of chemical space in bioactive substances: Microbial combined-culture method and precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) method

○掛谷 秀昭（京大院薬）
○Hideaki Kakeya (Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

当研究室では、多因子疾患（がん、感染症、心疾患など）を標的としたアカデミア発のオリジナル創薬に向けて、3 つの研究グループ体制（ケミカルバイオロジー研究グループ、天然物化学研究グループ、メディシナルケミストリー研究グループ）で教育・研究を展開している。すなわち、“切れ味の鋭い生物活性物質は、新しいサイエンスを切り拓く”の理念のもと、先導的ケミカルバイオロジー研究を機軸とした“天然物サイエンス”を世界へ発信している [1]。本シンポジウムでは、創薬リード化合物開発の基盤となりうる、微生物の複合培養法と precursor-directed *in situ* synthesis（PDSS）法を駆使した生物活性物質のケミカルスペース拡充戦略について紹介する。

異なる微生物の複合培養法は、クリプティック遺伝子等を活用した物質生産を可能にし、天然物創薬を促進する可能性を秘めている。我々は、エルゴステロール生合成経路に変異を持つ分裂酵母（*Saccharomyces pombe*）などを利用して、生体膜シグナル制御物質・抗真菌剤などの探索研究を展開し、*Streptomyces nigrescence* HEK616 と *Tsukamurella pulmonis*TP-B0596 の複合培養によって生産される 5aTHQs（5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline）類 [2] および streptoaminal 類 [3] を発見している（共同研究 : 尾仲宏康（東大院農）ら）。現在、ミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* TP-B0596 を利用して、さらなる応用研究を展開中である。

一方、生物活性物質のケミカルスペース拡充戦略において、希少放線菌の利用は有効である。我々は、ヒトがん細胞を用いた表現型スクリーニングと *in-house* LC-MS データベースを活用して、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が産生する新規細胞増殖阻害物質 saccharothriolide 類を発見している [4,5]。さらに我々は、saccharothriolide 類の生合成経路を研究する過程で、活性（不安定）中間体 X の同定に成功し、*Saccharothrix* sp. A1506 の培養抽出液に各種求核性アミンを添加することで、様々な saccharothriolide 類を創製できる precursor-directed *in situ* synthesis（PDSS）法を開発した [6,7]。この PDSS 法は、活性（不安定）天然物を含む様々な培養抽出液に応用可能である。

1)Kakeya, H. *Nat. Prod. Rep.* 33, 648 (2016); 2) Sugiyama, R. *et al*. *Org. Lett.* 17, 1918 (2015); 3) Sugiyama, R. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. 55, 10278 (2016); 4) Lu, S. *et al*. *Chem. Commun*. 51, 8074 (2015); 5) Lu, S. *et al. J. Nat. Prod*. 79, 1891 (2016); 6) Lu, S. *et al. J. Antibiot.* 70, 718 (2017); 7) Lu S. *et al.* submitted.

bioactive substances, combined-culture, precursor-directed *in situ* synthesis

発表責任者：掛谷秀昭（scseigyo-hisyo@pharm.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY28-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ A22 会場

人工知能を用いた化学コミュニケーション空間の多様性の解明に向けて

Computational analysis of structural diversity in chemical communication space

○榊原 康文 (慶應義塾大学)
○Yasubumi Sakakibara (Keio University)

生物活性リガンドとその相互作用に関わる膨大な情報が公開データベースに蓄積され，化学コミュニケーションビッグデータの時代が到来している．創薬のリード化合物の候補となる化合物データベース（PubChem）には 2 億 3 千万化合物，がん細胞に対する抗がん剤の感受性を網羅的に計測したがん細胞株百科事典（CCLE）には 1500 細胞株に関する情報がすでに蓄積されている．ビッグデータを網羅的に解析する手段の一つが統計的学習手法の利用である．膨大なデータの中から注目する特性を説明および識別する特徴量とルールを発見し，それらを未知データに適用することで意義のある予測を行う．統計学的学習手法の中で，最もよく用いられ，多分野で優れた性能を示してきた手法であるサポートベクターマシン（SVM）を用いて，我々は，タンパク質・化合物相互作用の網羅的予測システム COPICAT を開発し，化合物データベース PubChem からリード化合物を探索することを可能にした．コンピュータ予測とウエット検証実験を統合するフィードバック戦略手法を確立し，前立腺がんの原因遺伝子であるアンドロゲン受容体を標的タンパク質として，新規アンタゴニストの発見に成功した．本研究は世界的に注目され，Ultra High-Throughput Virtual Screening という分野のさきがけともなった．

一方，タンパク質・化合物相互作用の統計的学習は，単に高精度な相互作用予測を行うという応用上の利点だけに留まらない．大量のデータから学習されたモデルはタンパク質・化合物相互作用の背後に潜む普遍的ルール（例えば，相互作用する化合物とタンパク質の頻出部分構造）を表現するものであり，これらのルールを人間に理解可能な形で抽出することができれば，生物活性リガンドやその作用機序の統合的理解に貢献することができると考えられる．また，化合物をフィンガープリント法などを用いてベクトル表現することにより，化合物空間（ケミカルスペース）を可視化して，その多様性を解析することも可能となる．

近年，SVM と並んで，人工知能分野における深層学習という機械学習手法が，画像認識・音声認識・化合物の活性予測といったあらゆる分野で高い予測精度を実現したことで，大きな注目を集めている．我々は，新学術領域「化学コミュニケーションのフロンティア」の計画班として，巨大な分子構造を持つ天然物リガンドに深層学習の表現学習を適用する試みを行っている．表現学習を行うことにより，化合物の頻出部分構造やモチーフ構造などを自動的に獲得して，天然物の活性に関する普遍的なルールを解明することを目標としている．

Chemical space, Virtual screening, Deep learning

発表責任者：榊原 康文（yasu@bio.keio.ac.jp）

講演番号：4SY28-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ A22 会場

脂質合成を遮断する小分子化合物

Small Molecules That Block Lipid Synthesis

○上杉 志成（京都大学）
○Motonari Uesugi (Kyoto Univ.)

生体内の脂質レベルが低下すると、SREBP 転写因子が活性化され、脂質合成に関する遺伝子が発現される。生体内に脂質が十分に存在すれば、ステロールが SREBP 活性化を阻害し、脂質合成を調整している。我々は、これまでに SREBP 活性化を阻害する合成小分子ファトスタチンや FGH10019 を発見し、活用してきた。今回、SREBP 活性化に関わる新規内因性物質の探索を目的に、280 種の脂質誘導体ライブラリーをスクリーニングし、SREBP の活性化を阻害する内因性物質としてビタミンD誘導体を再発見した。ケミカルバイオロジー的な研究によると、その作用機構はステロールと異なる。

Chemical biology, Vitamin D, SREBP

講演番号：4SY28-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ A22 会場

ラットーマウス間のカイロモンの単離・同定・作用機構

Identification of a kairomone utilized between rat and mouse

○東原 和成（東大・農・応生）
○Kazushige Touhara (The University of Tokyo)

フェロモンは同種内のコミュニケーション使われる物質の総称である。一方、異種間の情報に使われる物質のうち、受け取り手にとって利益がある異種シグナルは、カイロモンと呼ばれる。我々は、捕食者−被捕食者の関係にあるラットとマウスの間におけるカイロモンの同定を目指した。カイロモンの発信源として涙液、受容器として第二の嗅覚器といわれている鋤鼻器官に着目した。まず、ラット涙液中にマウスの鋤鼻神経を活性化させる因子が存在することがわかった。そこで、その活性を指標に HPLC で標的物質を単離精製したところ、16 kDa の機能未知の分泌タンパク質が同定された。この物質はラットのオス特異的に分泌されていて、メスラットに対して性行動の一ステップである停止行動を引き起こすフェロモンであることがわかった。一方、その物質を受け取ったマウスにおいて、脳のどの領域にシグナルが入力され、どのような行動が引き起こされるか調べた。すると、マウス鋤鼻系の投射先である偏桃体内側核や視床下部腹内側核（VMH）で、神経活性化のマーカーである c-Fos が発現誘導していることが分かった。特に忌避行動やフリージング、不安行動に関わる背内側 VMH の SF1 発現ニューロンが活性化された。次に、各種行動実験を行ったところ、忌避行動、防御反応を誘発する効果は見られなかったが、活動量、体温、心拍数の低下が観察された。マウスはラットの涙液に含まれるフェロモンを感知して、自分の活動を低下させて息を潜める行動をとるということである。捕食者のラットがフェロモンとして使っている物質を、被捕食者であるマウスがハイジャックして感知して利益を得るという、カイロモンの例である。

kairomone, rat, mouse

発表責任者：東原和成（ktouhara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY29-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ A23 会場

疫病菌と宿主植物をつなぐ活性分子

Signal molecules that function between Phytophthora pathogen and host plant

○小鹿 一 (名古屋大学)
○Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

疫病菌は卵菌の一属 *Phytophthora* の総称で、しばしば農作物に甚大な被害を与える病原糸状菌である。中でもジャガイモ疫病菌 *P. infestans* は、1840 年代にアイルランドジャガイモ飢饉をもたらした元凶であり、近年もジャガイモ疫病による損害額は世界で数十億ドルと言われている。疫病菌は薬剤耐性株が出現しやすく、樹木に感染する凶悪な新種が出現するなど、農林業における重要課題の一つとなっている。疫病菌が植物と寄生関係を構築する際、様々な分子が働いている（図)。これらの活性分子とその作用機構を分子レベルで明らかにすることは､疫病菌コントロールの新たな方法論を展開するために不可欠であろう｡これまでに、(1)疫病菌が交配ホルモンの生合成を植物成分に依存すること、(2)宿主植物成分が疫病菌の無性生殖を制御すること、(3)疫病菌が新規エリシターとして２タイプの脂質をもつこと、を明らかにしたので紹介する。

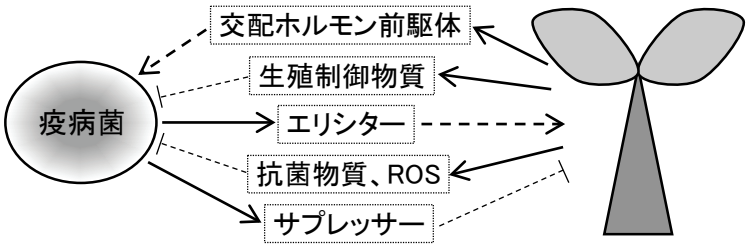


図. 疫病菌−宿主植物間ではたらく機能分子

（１）疫病菌交配ホルモンの生合成前駆体

疫病菌は２種類の交配ホルモンを使って交配型の違いを見分け、異なる交配型（A1, A2）が接近した時だけ有性生殖を行えるように進化している。すなわち、A1 交配型は A2 交配型が分泌するα2 を、A2 交配型は A1 交配型が分泌するα1 をそれぞれ感知して相手の存在を知り雌雄両生殖器官を分化させ受精に至る。これら交配ホルモンの生合成に植物成分フィトールが利用されていることが判明した。

（２）植物由来の疫病菌無性生殖制御物質

疫病菌の培地として汎用される野菜ジュースから疫病菌の無性生殖を阻害する一連の成分を発見した。これらは 2-8 μM の IC_{50} 値で遊走子嚢の形成を阻害した。またこれらの化合物は野菜ジュースの原材料のうちトマトのみに含まれ、品種間で含量に差があることが判った。

（３）疫病菌の新たな脂質エリシター

ジャガイモ疫病菌の MeOH 抽出物が、植物にファイトアレキシンと活性酸素種（ROS）の生成を顕著に誘導した。活性本体を精査した結果、ジアシルグリセロールがファイトアレキシンを、セラミド型脂質が ROS 生産を誘導することが判明した。脂質構造の僅かな違いが活性に影響することも判った。

plant pathogen, reproduction, elicitor

発表責任者：小鹿　一（ojika@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4SY29-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ A23 会場

微生物代謝産物の環境における機能
Function of microbial metabolites in environment

○作田 庄平（東大院農）
○Shohei Sakuda (Univ. of Tokyo)

これまで得られた微生物代謝産物の多くは、特定の微生物や微生物と他の生物間で機能する生物活性物質を除き、ヒトにとって有用あるいは有害との視点から見いだされてきた。従って、それら代謝物が有する、生産者である微生物側から見た場合の、成育環境における役割は不明である。医薬品のリード化合物等を見出すためのスクリーニングによって得られた有用物質の多くは、土壌等より分離した微生物を実験室で培養して生産させたものであり、実際の環境中で生産されるかどうかわからないものがほとんどである。有害物質の場合は、逆に、カビ等が実際の環境中で確実に生産するために問題となるが、ヒトや家畜の健康に害をなすものとして研究される。微生物代謝産物が有する成育環境における生態系や物質代謝での機能の解明は、農業や環境問題に新たな視点を与え、微生物とその代謝物活用の活性化につながると考えられる。ここでは、放線菌の代謝産物であるアロサミジンの環境での機能について考察する。

アロサミジンは、キチナーゼ阻害物質のスクリーニングで見いだされ、キチンミミックの擬似三糖構造を有する。アロサミジンは種々の生物のキチナーゼを阻害し、昆虫の脱皮阻害、マラリア原虫の寄生阻害、哺乳類での抗喘息作用等の活性を示した。一方、土壌分離放線菌においてアロサミジン生産菌の割合が５％以上と高かったため、アロサミジン生産菌におけるアロサミジンの生理的機能を考えた。キチン培地にアロサミジンを添加して培養すると、アロサミジンは数十 nM で生産菌のキチナーゼ生産および成育を強く促進した。生産が促進されるキチナーゼをアロサミジンは、キチナーゼ生産促進作用が最大となる濃度では全く阻害せず、また、生産菌のアロサミジン生産量も生理的濃度と考えられた。さらに、アロサミジンは生産菌だけでなく *Streptomyces* 属細菌に対して広くキチナーゼ生産促進作用を示した。放線菌は土壌に存在するキチンの主分解者であり、放線菌キチナーゼは土壌キチンの代謝に大きな影響を与えると考えられる。従って、アロサミジンのキチナーゼ生産促進作用は、土壌キチンの分解を促進し、生じたキチン分解物は、栄養源として利用され、また、植物等へのシグナル物質として機能し、菌叢や生態系に影響を与える可能性がある。キチンを単一の炭素源とした液体培地に土壌を添加し培養する際にアロサミジンを加えたところ、無添加の場合に比べてキチン培地上での放線菌のコロニー数が大幅に増加した。また、シロイヌナズナを、アロサミジンをキチンとともに添加した土壌あるいは寒天培地で生育させたところ、生育促進作用が見られた。

allosamidin, Streptomyces, chitinase

講演番号：4SY29-3
講演日時、会場：3 月 18 日 09:55～ A23 会場

昆虫ホルモン生合成調節のケミカルバイオロジー

Chemical biology of insect hormone biosynthesis

○丹羽 隆介 [1,2] ([1] 筑波大生命環境、[2] 高エネ研物質構造科学)
○Ryusuke Niwa[1,2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]KEK IMSS)

昆虫発生の進行には、エクジステロイドと呼ばれるステロイドホルモンが重要な役割を果たす。エクジステロイドの生合成酵素および受容体は、昆虫には存在するが、哺乳動物を含む後口動物には存在しないと考えられている。よって、エクジステロイドの生合成や受容を阻害する化合物は、標的選択性が高く環境に調和した昆虫成長制御剤（IGR）になると期待される。

我々は、エクジステロイド生合成に特異的に関与するグルタチオン *S*-転移酵素（GST）である Noppera-bo [1,2] をターゲットとした酵素活性阻害化合物の探索、およびその作用機序の解明を通じて、将来的な新しい IGR の発掘・開発を目指している[3]。現在までに我々は、組換え Noppera-bo タンパク質のグルタチオン抱合活性を、GST 活性検出蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いて高感度で検出するアッセイ系を確立している [3]。

現在までに我々は、このシステムと化合物ライブラリーを活用して、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、ハマダラカ *Anopheles gambiae*、そしてコナガ *Plutella xylostella* に由来する組換え Noppera-bo タンパク質のいずれに対しても *in vitro* で阻害活性を示す化合物を複数種類見出した。これらの化合物の中には、哺乳動物の女性ホルモンである β-エストラジオールが含まれていた [4]。この結果は、哺乳動物と昆虫を「つなぐ」化合物の存在を提示する点でも興味を惹かれる。

本発表では、昆虫ホルモン生合成調節のケミカルバイオロジーの一事例として、ハイスループットスクリーニング系、生化学的解析、X 線結晶構造解析、分子動力学シミュレーション、そしてショウジョウバエの分子遺伝学を併用した我々のアプローチを紹介し、Noppera-bo と β-エストラジオールの相互作用の研究成果を報告する。合わせて、Noppera-bo をターゲットとした創農薬に向けた試みについても報告したい。

[1] Enya et al. *Sci. Rep.* 4:6586, 2014.
[2] Enya et al. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61: 1-7, 2015.
[3] 丹羽隆介. *化学と生物* 54: 508-513, 2016.
[4] Fujikawa et al. *Chem. Comm.* 51: 11459-11462, 2015.

steroid hormone, GST, insect growth regulator

発表責任者：丹羽隆介（ryusuke-niwa@umin.ac.jp）

講演番号：4SY29-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:20～ A23 会場

キノコと植物をつなぐ活性分子
Small molecules connecting mushrooms and plants

○河岸 洋和 (静大グリーン研)
○Hirokazu Kawagishi (Shizuoka Univ.)

公園やゴルフ場などで芝生が輪状に周囲より色濃く繁茂し，時には逆に輪状に成長が抑制され，後にキノコが発生する現象をフェアリーリング（fairy rings，妖精の輪）と呼ぶ。我々は，フェアリーリングを惹起する物質 3 種，2-アザヒポキサンチン（2-azahypoxanthine，AHX)，イミダゾール-4-カルボキサミド（imidazole-4-carboxamide， ICA)，2-アザ-8-オキソヒポキサンチン （2-aza8-oxohypoxanthine，AOH)をキノコから発見し，フェアリー化合物（fairy chemicals， FCs）と命名した。その後，FCs はキノコばかりでは無く，植物に普遍的に内生していることが判明した。

FCs は試した全ての植物の成長を制御し，米，小麦などの穀物や野菜類の収量を大幅に増加させた。しかも，低温，高温，塩，乾燥などの悪条件でさらに効果を発揮した。

我々は FCs の生合成経路も明らかにしつつあり，FCs が生物共通のプリン代謝経路にある 5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミド (5-aminoimidazole-4-carboxamide，AICA) から生合成されることを明らかにした。

現在，植物とキノコにおける，さらなる生合成・代謝経路，活性発現機構を検討している。

参考文献

1) 河岸洋和，“フェアリーリング”の化学と“フェアリー化合物”の植物成長調剤としての可能性，化学と生物，52，665-670 (2014).
2) 河岸洋和，フェアリー化合物を追って －新たな植物成長促進物質の発見と応用への期待，化学，71,12-15 (2016)
3) Choi, J-H.et al., Disclosure of the “fairy” of fairy-ring forming fungus *Lepista sordida*, ChemBioChem, 11, 1373-1377 (2010)
4) Choi, J-H. et al., Plant-growth regulator, imidazole-4-carboxamide produced by fairy-ring forming fungus *Lepista sordida*. J. Agric. Food Chem., 58, 9956-9959 (2010).
5) Choi, J-H. et al., The source of ″fairy rings″: 2-azahypoxanthine and its metabolite found in a novel purine metabolic pathway in plants, Angew. Chem. Int. Ed., 53, 1552-1555 (2014).
6) Tobina, H. et al., 2-Azahypoxanthine and Imidazole-4-carboxamide produced by the fairy-ring-forming fungus increase yields of wheat, Field Crop Res., 162, 6-11 (2014).
7) Asai, T. et al., Effect of 2-azahypoxanthine (AHX) produced by the fairy-ring-forming fungus on the growth and the grain yield of rice, Jpn. Agric. Res. Quart., 49, 45-49(2015).
8) Suzuki, T. et al., The biosynthetic pathway of 2-azahypoxanthine in fairy-ring forming fungus., Sci. Rep., 6, 39087(2016).

fairy rings, mushroom, plant

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4SY29-5
講演日時、会場：3 月 18 日 10:45～ A23 会場

ケミカルテクノロジーによる根圏における植物間相互作用の on と off
Chemical regulation of plants-plants interactions in rhizosphere

○浅見 忠男（東大院農生科）
○Tadao ASAMI (Grd Sc Agric Lif Sci, Univ Tokyo,)

GA 生合成阻害剤を用いた GA 機能抑制技術は穀物生産性向上に大きく貢献しており、植物ホルモン機能の制御による農業生産性向上可能な新技術創出への期待は大きい。我々の研究室では農業生産性の向上に関わる単独かつ直接的な植物ホルモン機能制御のみならず植物ホルモン間クロストークを利用した機能制御に注目し、その機能の化学的な on と off 制御法の開発と生理学・遺伝学に加えて実用面での応用を目指してきた。以下、創製した化合物とその植物科学への応用ならびに制御剤の実用化への取り組みについて、根寄生雑草被害の防除という観点を中心に述べる。

ストリゴラクトン（SL）は植物ホルモン作用である枝分かれ（イネ科では分げつ）抑制作用以外にも、AM 菌との共生促進作用や根寄生雑草種子の発芽を促進し寄生を促すことで農作物に多大な被害を生じさせる作用を示す物質であるために、その化学的制御法は応用展開の可能性が高い重要な研究対象である。まず SL 生合成経路に存在するチトクローム P450 を標的と想定した阻害剤開発を行い、トリアゾール系 SL 生合成阻害剤 Stz (TIS108) を見出した。Stz は nM レベルでイネ中の SL 濃度を検出限界以下に低下させる強力な阻害剤であるが、植物種によってはまったく枝分かれを誘導しないことから、生体内で生合成される SL 関連分子種による機能の違いを明確にできる可能性を秘めた化合物である。また TIS108 はその性格からイネと根寄生雑草間の相互作用を断ち切る事のできる物質であり、実際に TIS108 処理した植物体では著しい寄生率の低下を確認できた。現在、実用性について検討中である。また SL 生合成を抑制する物質としてジベレリン (GA)を見出した。実用性の観点から GA アゴニストの探索を行い複数の物質を見いだすことができた。さらにイネ SL 受容体 D14 の阻害剤開発を行い、動物のαβ-加水分解酵阻害剤に着想を得て設計・合成展開した結果、受容体 D14 に共有結合しイネに多分げつ形態を誘導する阻害剤 KOK1094 を見出した。両化合物の類縁体中には、根寄生雑草の発芽阻害活性を示す化合物も存在していたので、分げつ誘導と発芽阻害の各活性を個別に高める方向で合成展開を行っている。続いて阻害剤と併用することで自在な SL 制御を可能とする SL アゴニスト 4BD を見出した。4BD は現在ではイネ試験における標準物質として広く利用され実用化も検討されているが、イネ分げつ抑制特異的な化合物であり、根寄生雑草 *Striga* 種子発芽促進活性は著しく弱い。そこでストリゴラクトン D 環構造を有する化合物の合成展開を行い、*Striga* 種子発芽促進活性が高い TIT01、2F4CD, KOK を見出すことができた。今後はこれら化合物を利用して SL 生合成や情報伝達を追究する予定である。

plant hormone, strigolactone, root parasitic weeds

発表責任者：浅見忠男（asami@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY29-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:10～ A23 会場

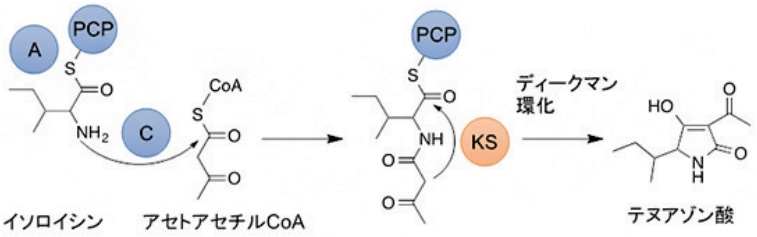
いもち病菌におけるテヌアゾン酸生合成とイネへの感染戦略

Biosynthesis of tenuazonic acid in pathogenic fungi and the strategy of infection to rice

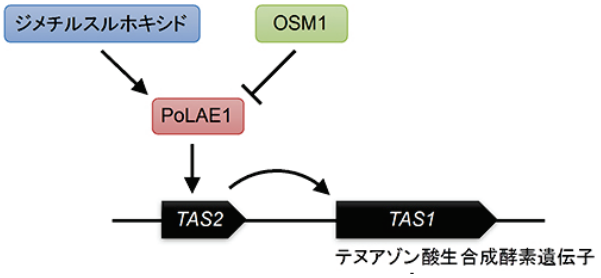
○長田 裕之、尹 忠銖、本山 高幸（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Hiroyuki OSADA, Choong-Soo YUN, Takayuki MOTOYAMA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* は、かび毒の一種であるテヌアゾン酸を生産するが、その生合成機構に関しては長年不明であった。我々は、*P. oryzae* のテヌアゾン酸生産を誘導する条件を検討した結果、二成分情報伝達系で働く p38 MAP キナーゼ *OSM1* の遺伝子破壊によりテヌアゾン酸の生産が誘導されることを見出した。さらに、テヌアゾン酸生産を誘導する化合物を探索している過程で、DMSO 添加でテヌアゾン酸生産が誘導されることを見出した。

テヌアゾン酸の化学構造から、PKS-NRPS 融合酵素によって生産されると予想して、*OSM1* 破壊または DMSO 添加で誘導される遺伝子を探索した。予想に反して、上記に条件で誘導された遺伝子は、PKS-NRPS 型ではなく、それまで糸状菌では報告がなかった NRPS-PKS 型の遺伝子（*TAS1* と命名）であった。TAS1 タンパク質は、イソロイシンとアセトアセチル CoA からテヌアゾン酸を生合成するユニークな酵素であることが明らかになった[1)]。



また、*P. oryzae* のゲノム解析と遺伝子破壊実験から、*TAS1* 遺伝子の上流に $Zn(II)_2$-Cys_6 型転写因子をコードする遺伝子（*TAS2* ）が見出され、TAS2 がテヌアゾン酸特異的転写因子であることを明らかにした。また、糸状菌において二次代謝制御因子として知られる LaeA のオルソログである PoLAE1 がテヌアゾン酸生産誘導に関わっていることを明らかにした[2)]。



本シンポジウムでは、植物病原菌と、その宿主の感染防御反応におけるテヌアゾン酸の関与について考察する。

1) CS Yun, T Motoyama & H Osada: **Nature Communications** 6: 8758 (2015)
2) CS Yun, T Motoyama & H Osada: **ACS Chemical Biology** 12: 2270 (2017)

mycotoxin, plant pathogen, biosynthesis

発表責任者：長田裕之（hisyo@riken.jp）

委員会企画シンポジウム

名古屋大会では，本会の学術活動強化委員会が企画するシンポジウム 2 件，産学官学術交流委員会が企画するシンポジウム 1 件が開催されます．

学術活動強化委員会は，農芸化学分野と関連が深い分野の学会と垣根を超えた交流と相互の発展を推進することを目的として，日本土壌肥料学会，日本ケミカルバイオロジー学会との共催シンポジウムを開催することにいたしました．

産学官学術交流委員会は，農林水産業，食品産業，生活産業等での真のイノベーションを創出するための活動に，農芸化学がいかに重要か，アカデミアと産業界の間にどのような課題があるのか，そして今後の産学官連携のあり方はどうあるのがよいのかを議論するシンポジウムを開催いたします．

皆様，奮ってご参加ください．

3 月 16 日（金）14:00〜17:00

【学術活動強化委員会企画シンポジウム】

2CS01 【日本土壌肥料学会との合同企画】生物による無機元素の認識と反応の新展開

共　催：日本土壌肥料学会
3 月 16 日（金） 14:00〜17:00　B02 会場（共通講義棟南　1 階　S102）
世話人：藤原　徹（東大院農生科），高野順平（大阪府大院生命環境），鈴木道生（東大院農生科）
座　長：藤原　徹（東大院農生科），高野順平（大阪府大院生命環境），鈴木道生（東大院農生科）

14:00　　はじめに……藤原　徹（東大院農生科）
14:05　2CS01-1　哺乳類亜鉛トランスポーターの発現制御と生理機能……○神戸大朋（京大院生命科学）
14:35　2CS01-2　ホウ酸トランスポーターの分解を制御するホウ酸認識機構……○高野順平（大阪府大院生命環境）
15:00　2CS01-3　翻訳装置によるホウ素感知と輸送体発現制御
……三輪京子[1]，○藤原　徹[2]（[1]北大地球環境，[2]東大院農生科）
15:25　　休憩
15:30　2CS01-4　ヘムセンサータンパク質 HrtR による細胞内ヘム濃度制御の分子機構……○青野重利（分子研）
16:00　2CS01-5　植物の鉄欠乏応答と鉄感知……○小林高範（石川県大生物資源工学）
16:30　2CS01-6　バイオミネラルタンパク質による炭酸カルシウム結晶のナノ構造制御 ……○鈴木道生（東大院農生科）
16:55　　おわりに……高野順平（大阪府大院生命環境）

3 月 16 日（金）15:00〜18:00

2CS02 【日本ケミカルバイオロジー学会との合同企画】ケミカルバイオロジー研究の最前線

共　催：日本ケミカルバイオロジー学会
3 月 16 日（金） 15:00〜18:00　B03 会場（共通講義棟南　1 階　S103）
世話人：西川俊夫（名大院生命農学），大神田淳子（信州大院農），臼井健郎（筑波大生命環境），佐藤綾人（名大 ITbM）
座　長：西川俊夫（名大院生命農学），大神田淳子（信州大院農），臼井健郎（筑波大生命環境），佐藤綾人（名大 ITbM）

15:00　　開会挨拶……吉田　稔（理研）
15:05　2CS02-1　ゲノム情報を利用した新規植物ペプチドホルモン探索……○松林嘉克（名大院理）
15:35　2CS02-2　植物ホルモンシグナルの人工的制御 ……○萩原伸也[1,2]（[1]名大院理，[2]JST さきがけ）
16:00　2CS02-3　ジテルペン配糖体によるたんぱく質間相互作用の制御……○大神田淳子（信州大院農）
16:30　2CS02-4　タンパク質－生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発
……○北　将樹[1,2]（[1]名大院生命農，[2]JST さきがけ）
16:55　2CS02-5　GLUT4 の糖鎖機能を可視化する局在痕跡イメージングプローブ
……○菊地和也[1,2]（[1]阪大工，[2]阪大免フロ）
17:25　2CS02-6　小分子化合物の新しい可能性：遺伝病治療や再生医療の実現に向けて ……○萩原正敏（京大医）
17:55　　閉会挨拶……西川俊夫（名大院生命農学）

講演番号：2CS01-1
講演日時、会場：3 月 16 日 14:05～ B02 会場

哺乳類亜鉛トランスポーターの発現制御と生理機能

Expression regulation and physiological functions of mammalian zinc transporters

○神戸 大朋（京大院生命科学）
○Taiho Kambe (Kyoto Univ.)

亜鉛は、タンパク質の構造因子・酵素の補因子・細胞内外のシグナル因子として機能する必須微量元素である。そのため、亜鉛が不足すると味覚障害や皮膚炎に代表される欠乏症状が現れる。近年、高齢者においてその数が増加の一途を辿っているため、日常生活において亜鉛を充足させ、組織・細胞レベルで亜鉛ホメオスタシスを正常に保つことが極めて重要となっている。生体内亜鉛ホメオスタシスの維持には、亜鉛トランスポーターが極めて重要な役割を果たす。哺乳類においては、亜鉛トランスポーターが合わせて 20 種以上発現しており、ZIP と ZNT の２つのファミリーに大別される。それぞれが、組織・細胞・細胞内小器官に特異的に発現し、多彩な生理機能を発揮する。特に、体内亜鉛ホメオスタシス維持に働く亜鉛トランスポーターの発現は、亜鉛濃度に応じて mRNA レベルのみならずタンパク質レベルにおいても厳密な制御を受けている。

消化管での亜鉛吸収に必須の役割を果たす ZIP4 は、タンパク質レベルで発現制御されており、亜鉛欠乏時にのみ上皮細胞アピカル膜での発現が増加するよう厳密に制御されている。我々のグループでは、細胞膜に発現する ZIP4 は、亜鉛濃度が上昇すると速やかにエンドサイトーシスされて細胞内に取り込まれ、分解されることを明らかにしてきた。また、著しい亜鉛欠乏状態に陥ると、ZIP4 タンパク質は細胞外領域が切断除去（プロセシング）され、残った膜貫通領域（トランスポーター本体）は、再び頂端膜に蓄積するという現象が観察される。このような ZIP4 の発現制御は、亜鉛吸収効率の調節に機能すると考えられている。一方、上皮細胞バソラテラル膜には、ZIP4 が管腔から取り込んだ亜鉛を血液中に放出する機能を果たす亜鉛トランスポーターZNT1 が機能する。ZNT1 の発現制御に関しては、これまで、亜鉛濃度に応じた転写制御が中心であると考えられていたが、最近、我々は ZNT1 の発現がタンパク質レベルでもダイナミックな制御を受けていることを突き止めている。

本発表では、これら ZIP4 や ZNT1 の亜鉛レベルに応じた発現制御について概説すると共に、ZNT トランスポーターの輸送基質認識制御や酵素反応活性制御との関わりについての研究成果について紹介したい。

Zinc, Transporter, Absorption

発表責任者：神戸大朋（kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2CS01-2
講演日時、会場：3 月 16 日 14:35～ B02 会場

ホウ酸トランスポーターの分解を制御するホウ酸認識機構
A boron sensing mechanism controlling degradation of a borate transporter
○高野 順平（大阪府大生命環境）
○Junpei TAKANO (Osaka Prefec. Univ.)

メタロイド元素であるホウ素は高等植物の必須無機栄養素の一つであり、細胞壁ペクチンを架橋することで細胞壁の構造と機能に重要な働きを担う。ホウ素は水溶液中では主にホウ酸 $B(OH)_3$ の形態で存在する。ホウ酸は雨水に溶けて流失しやすいため、日本を含む湿潤な地帯においてホウ素欠乏は作物の生育を阻害する農業上の問題となっている。一方、南オーストラリアやカリフォルニア、中東といった乾燥地ではホウ酸が土壌に蓄積し、作物が過剰害を受けやすい。植物はホウ素欠乏および過剰環境に適応するため、土壌中のホウ酸濃度に応じてホウ酸の吸収と体内移行を制御している。

ホウ酸は無電荷の小分子であるため生体膜を比較的速く透過拡散できるが、低ホウ素環境に置かれた植物では拡散だけでは需要を満たすことができず、二つのタイプの輸送タンパク質を必要とする。一つはシロイヌナズナ NIP5;1 をはじめとするホウ酸チャネルであり、細胞へのホウ酸吸収を促進する。もう一つはシロイヌナズナ BOR1 をはじめとするホウ酸アニオントランスポーターであり，細胞からのホウ酸排出を促進する。NIP5;1 と BOR1 は共同して根へのホウ素吸収と中心柱への輸送を促進する。興味深いことに、NIP5;1 と BOR1 は根の様々な細胞においてそれぞれ外寄り（土壌側）と内寄り（根の中心側）の細胞膜ドメインに偏って局在する。私たちは最近、NIP5;1 の土壌側偏在のメカニズムの一端を明らかにし、変異型 NIP5;1 を用いることで偏在性が根におけるホウ酸輸送に重要であることを示した。偏在性を示す栄養素輸送タンパク質は次々と報告されているが、偏在の生理学的重要性を初めて実証することができた。

私たちはまた、高濃度のホウ酸に応答し BOR1 がユビキチン化され、エンドサイトーシスにより液胞で分解される現象を発見している。これはホウ素の過剰蓄積を防ぐための応答反応である。私たちは本応答反応を引き起こすホウ酸センシングのメカニズムの研究を進め、ユビキチン化にホウ酸輸送活性が必要なことを見出している。BOR1 のホウ酸輸送に伴うコンフォメーション変化が C 末端細胞質側領域におけるユビキチン化を促進するモデルを考えているので紹介したい。

Plant, Transporter, Sensing

発表責任者：高野順平（jtakano@plant.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2CS01-3
講演日時、会場：3 月 16 日 15:00～ B02 会場

翻訳装置によるホウ素感知と輸送体発現制御
Boron sensing by translational machinery and regulation of transporter expression
三輪 京子[1]、○藤原 徹[2] ([1] 北大地球環境、[2] 東大院農生科)
Kyoko Miwa[1], ○Toru Fujiwara[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Univ. Tokyo)

植物は独立栄養生物であり、その生育は土壌の無機必須元素の吸収に依存する。土壌の必須元素はほとんどの場合適切な濃度範囲に無く、植物は栄養濃度に応じて吸収や成長を制御して適応する。この適応には無機栄養の感知とそれに伴った反応が引き起こされる必要がある。演者らはこれまで植物の必須元素であるホウ素の輸送体を同定し、輸送体を利用した応用研究や、輸送体の制御についての研究を進めてきたが、最近の研究で、ホウ素輸送体のホウ素栄養条件に応じた発現制御が、細胞質のホウ素濃度に応じた翻訳の制御を通じて起こっていることを見出したので紹介する。

シロイヌナズナのホウ素輸送には BOR と NIP という異なるタイプのホウ素輸送体がホウ素欠乏条件でのホウ素の効率的な吸収土地上部への輸送に重要な役割を果たしているが、いずれの輸送体もホウ素条件に応じて発現制御を受ける。*NIP5;1* の場合には、ホウ素欠乏で mRNA の蓄積が増加する。この mRNA の増加はホウ素条件に応じた mRNA 分解によって制御されている(Tanaka et al 2011)。この mRNA 分解は 5’非翻訳領域に存在する最も短い ORF である AUGUAA 配列上にリボソームがホウ素依存的に停止することに伴って起こることを見出した(Tanaka et al 2016)。このホウ素に応じた翻訳制御は *in vitro* translation システムでも起こることから、*NIP5;1* の発現制御は細胞質のホウ素濃度を翻訳装置が感知し、それに伴ったリボソームの挙動の変化によって起こることが示唆された。この翻訳を通じたホウ素依存的な mRNA 分解を受けない変異型の *NIP5;1* を発現するシロイヌナズナは、ホウ素過剰に感受性になることから、細胞質ホウ素濃度の感知とそれに伴った *NIP5;1* の発現制御は土壌のホウ素濃度が低い時に重要な輸送体を発現させ、かつ土壌のホウ素濃度が高い時には不必要な輸送体を発現させないようにすることで、毒性も併せ持つホウ素が地上部へ輸送されすぎるのを防いでいると考えられる。また、*BOR1* についてはホウ素条件に応じた発現制御がタンパク質の分解レベルで起こることを見出していた（Takano et al 2005, 2010）が、*NIP5;1* 同様に *BOR1* の場合にもホウ素濃度に応じて 5’非翻訳領域依存的な翻訳調節を受けることが明らかになった。この調節には、*NIP5;1* の場合に重要な AUGUAA 配列以外の複数の上流 ORF が関与しており、*NIP5;1* とは異なる仕組みによって制御が起こっていると考えられ、この翻訳調節によって、ホウ素過剰条件で必要以上にホウ素が地上部に輸送されてしまうことを防いでいると考えられる。

翻訳を通じた無機元素の感知は原核生物では例が知られているものの、真核生物では知られておらず、今後様々なミネラルや遺伝子について同様の制御が見出される可能性が考えられる。

boron, ribosome, translation

発表責任者：藤原　徹（atorufu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2CS01-4
講演日時、会場：3 月 16 日 15:30～ B02 会場

ヘムセンサータンパク質 HrtR による細胞内ヘム濃度制御の分子機構

Molecular mechanism of the regulation of intracellular heme concentrations by heme sensor protein HrtR

○青野 重利（分子研）
○Shigetoshi Aono (IMS)

乳酸菌 *Lactococcus lactis* は、ヘムの生合成系を欠損しているが、外部からヘム分子を取込むことにより、取込んだヘム分子を末端酸化酵素（シトクローム *bd*）の補欠分子族として利用し、酸素呼吸による生育することが可能となる。細胞内に取込まれたフリーなヘム分子が過剰に存在すると、細胞毒性を示す。このような細胞毒性を回避するため、細胞のヘム濃度は厳密に制御されている。乳酸菌においては、細胞内に過剰なヘム分子が存在する場合には、トランスポーター（HrtAB）タンパク質により、フリーなヘム分子を細胞外へ排出することにより、細胞内ヘム濃度を制御していると考えられている。本制御系では、転写調節因子 HrtR がヘム分子のセンサーとして機能し、HrtR が細胞内の過剰なヘム分子の存在を感知することにより HrtAB の発現が誘導される。本講演では、HrtR によるヘムセンシング、およびヘム分子がエフェクターとして機能する転写制御の分子機構について紹介する。

HrtR の DNA 結合能は、ヘム分子の結合･解離により制御されている。すなわち、ヘムを結合していないアポ型 HrtR が標的 DNA に対する特異的結合能を有しており、HrtR にヘムが結合することにより、その特異的 DNA 結合能が失われ、標的 DNA から解離する。アポ型 HrtR による標的 DNA の認識機構を明らかにするため、標的 DNA・アポ型 HrtR 複合体の結晶構造解析を行い、その構造決定に成功した。HrtR と標的 DNA との相互作用を調べたところ、Tyr50 の側鎖とチミン 12 との間で、CH-π 相互作用が、Arg46 の側鎖とグアニン 11 の間で水素結合が観測された。HrtR による標的 DNA 配列の認識、および特異的 DNA 結合能発現には、Arg46 と Tyr50 の存在が必須であることが分かった。

標的 DNA・アポ型 HrtR 複合体の結晶構造に加え、ヘムを結合したホロ型 HrtR の結晶構造決定にも成功した。HrtR では、N 末領域が、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造を DNA 結合モチーフとする DNA 結合ドメインを構成している。エフェクター分子であるヘムの結合サイトは、C 末領域に存在する疎水性キャビティー中に存在しており、His72 と His149 が軸配位子としてヘムに配位することが分かった。また、ヘム結合に伴って HrtR 中のα4 ヘリックス部分にコイル・ヘリックス転移が誘起され、その結果 DNA 結合ドメインの相対配置が変化することにより DNA 結合能を失うことが分かった。

heme, sensor protein, Lactococcus lactis

発表責任者：青野重利（aono@ims.ac.jp）

講演番号：2CS01-5
講演日時、会場：3 月 16 日 16:00～ B02 会場

植物の鉄欠乏応答と鉄感知
Iron deficiency responses and iron sensing in plants
○小林 高範（石川県大生物資源工学）
○Takanori Kobayashi (Ishikawa Pref. Univ.)

鉄は全ての動植物とほぼ全ての微生物にとって必須な元素であり、呼吸や光合成における電子伝達系、種々の酵素反応、動物における酸素運搬など多種多様な生体反応に必須の役割を果たしている。植物が土壌中から吸収する鉄は、植物の生育に必要なだけでなく、人間が食品を介して摂取する鉄分の由来となる。土壌中には鉄は豊富に存在するが、通常の好気的条件下では難溶性で植物に吸収されにくい。鉄の溶解度は pH が高くなるとますます低下するため、世界の耕地土壌の約３割を占める石灰質アルカリ土壌では植物は特に鉄欠乏症状を起こすことが多く、農業や環境面で深刻な問題となっている。

植物の鉄獲得機構は、イネ科以外の全ての高等植物が持つ「Strategy I」とイネ科植物が持つ「Strategy II」とに大別される。Strategy I は根表皮の三価鉄キレート還元酵素による鉄の還元と、それに続く二価鉄イオンの吸収を主体としている。一方、Strategy II は三価鉄キレーターであるムギネ酸類によるものである。イネ科植物は根でムギネ酸類を合成して分泌し、これが土壌中の難溶性の三価鉄を溶かし出すことにより生成した三価鉄・ムギネ酸類複合体を吸収する。

これらの機構の違いに関わらず全ての植物は、鉄の不足を感知すると鉄の吸収や移行に関与する様々な遺伝子を一斉に発現誘導することにより、生育に必要な鉄を確保しようとする。この鉄欠乏応答は主に転写制御によって行われており、モデル植物のイネ、シロイヌナズナなどで転写制御ネットワークが明らかになりつつある。

これらの鉄欠乏応答の最上流に位置すると考えられる鉄センサーとシグナルの実体は明らかになっていないが、発表者らは２種類の鉄結合因子が植物細胞内鉄センサーの候補分子であることを提唱している。１つはイネ科植物に特異的な転写因子 IDEF1 である。IDEF1 は二価鉄および他の二価金属と可逆的に結合し、イネの鉄欠乏の初期応答を正に制御する。もう１種の鉄センサー候補は鉄・亜鉛結合性ユビキチンリガーゼ HRZ である。HRZ は 5 種類の金属結合ドメインとユビキチン化触媒ドメインを合わせ持つ特徴的な構造をしており、植物から藻類まで保存されている。HRZ は鉄欠乏応答の負の制御因子であり、*HRZ* の発現を抑制したイネは鉄欠乏に耐性を示し、茎葉と種子に鉄を多く蓄積する。このような局所的な鉄感知に加えて、植物では葉の鉄栄養状態を篩管を通じて根に伝える長距離シグナルが存在し、両者が統合されて鉄欠乏応答が制御されていると考えられている。

本発表では、これらの鉄欠乏応答および鉄感知のメカニズムについての概要を紹介する。

Iron deficiency, Iron sensing, Plants

発表責任者：小林　高範（abkoba@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2CS01-6
講演日時、会場：3 月 16 日 16:30～ B02 会場

バイオミネラルタンパク質による炭酸カルシウム結晶のナノ構造制御

Regulation of nano-structure in calcium carbonate crystals by biominerals proteins.

○鈴木 道生（東大院農）
○Michio Suzuki (Univ. Tokyo)

生物が無機物である鉱物を利用して生体防御やミネラルの貯蔵、重力感知などに利用していることはよく知られている。このような生体による生成される鉱物をバイオミネラルと呼ぶ。バイオミネラルは人類が容易には作ることができないような緻密な微細構造を有するが、これは主にバイオミネラル内に含まれる有機基質の働きによるものだと考えられている。発表者は日本では真珠養殖に利用される貝類として知られるアコヤガイを用いて研究を進めてきた。アコヤガイは、300-400 nm と非常に薄い扁平状の炭酸カルシウムが積層した真珠構造を作ることから、真珠の養殖に利用されている。真珠層に関しては多くの研究がなされているが、アコヤガイの貝殻には真珠層以外にも多くの非常に制御された炭酸カルシウム微細構造を有している。これらの形成メカニズムに着目した研究を紹介する。

二枚貝貝殻の蝶番部分に存在する靭帯は、直径は 100 nm 以下の極細の繊維状の炭酸カルシウム結晶を含み、各々の繊維の中央部に、伸長方向に平行に配置された 1 つもしくは 2 つの{110}双晶面を含むことが知られている。このような極細の炭酸カルシウム結晶が方向を揃えて配向する現象は人工的に作り出すことは不可能であり、何らかの機能的な有機基質を利用しアコヤガイは炭酸カルシウム結晶の形態と成長方向を制御している可能性が示唆された。そこで、アコヤガイ蝶番部に存在する靭帯に着目し、その炭酸カルシウム結晶形成を制御する有機基質の探索を試みた。

靭帯部から針状の炭酸カルシウム結晶のみを取り出し、結晶の内部から有機基質の精製を行った。質量分析の結果から、この分子は低分子のペプチドであることが判明し、その構造と機能の解析を行うこととした。この低分子ペプチドの配列を決定したところ、10 アミノ酸から成る酸性ペプチドであることが判明した。この配列は新規のものであったことから LICP (ligament intracrystalline peptide) と命名した。この配列を元にアコヤガイゲノムデータベースより cDNA 配列の探索を試みたが、登録されている遺伝子の配列からは検索されず、ゲノム配列内に部分配列が存在するだけであった。そこで、その配列を元に RT-PCR および RACE 法を用いて全 cDNA 配列の決定を行った。また、LICP を化学合成し、炭酸カルシウム結晶形成実験を行ったところ、*c* 軸方向への成長が抑制された微小な炭酸カルシウム結晶が形成された。このことから LICP は結晶の *c* 軸方向の成長を抑えることで、細く短い結晶を多数作り出し、それらが連続的に配向することで極細の繊維状炭酸カルシウム結晶が作られ、靭帯が形成されると考えられた。現在は短い炭酸カルシウム結晶がどのように靭帯内で配向するのか、そのメカニズムに関する研究を続けて行っている。

biomineral, calcium carbonate, inorganic chemistry

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2CS02-1
講演日時、会場：3 月 16 日 15:05～ B03 会場

ゲノム情報を利用した新規植物ペプチドホルモン探索

Identification of novel peptide hormones in plants by *in silico* screening

○松林 嘉克（名大理）
○Yoshikatsu Matsubayashi (Nagoya Univ.)

「ものとり」では，まず特定の明確な生命現象に注目し，次に生物検定を用いてこれに関わる鍵分子の同定を進め，最終的にメカニズムを説明するのが一般的なアプローチである．しかし，まず最初に特定の機能未知分子に着目し，その機能探索を経て，最終的に新たなしくみや生命現象の発見を目指したら，どのようなバイオロジーが生まれるだろうか．対象をペプチドホルモンに限るならば，その配列はすでにゲノム上に記されているはずであり，適切な目印を見つけられれば膨大な数の遺伝子の中からペプチドホルモン遺伝子候補を絞り込むことができるのではないか．

この発想に基づいて，我々はモデル植物であるシロイヌナズナのゲノムデータベースを利用して新規ペプチドホルモン探索を進めてきた．ペプチドホルモンの一部には 10 から 20 アミノ酸程度の短鎖のものがあり，これらは前駆体ペプチドの一部が切り出されることでつくられる．興味深いことに，これまでに見出された短鎖ペプチドホルモンの前駆体ポリペプチド配列には，いくつかの構造上の共通点が見出される．それは，(a) N 末端に分泌型シグナル配列を持つ，(b) 全長が 100 アミノ酸程度，(c) C 末端付近に保存配列を持つ多重ファミリーを形成しており，この保存配列部分が切り出されて成熟型ペプチドとなる，(d) 成熟型ペプチドは翻訳後修飾を受けている，などの特徴である．成熟型ペプチドとなる部分以外の領域は酵素的切断により除去されるため，分子進化の過程であまり選択圧を受けず，結果的にアミノ酸変異が蓄積するものと思われる．これらの傾向は植物種を超えて普遍的である．そこで，これらの特徴を持つ ORF をシロイヌナズナのゲノムデータベースから *in silico* 抽出し，実際に細胞外に分泌されるペプチドの構造を Nano LC-MS/MS で解析することで，新しいペプチドホルモン候補を探索した．その結果，複数の短鎖翻訳後修飾ペプチドが見出された．さらに，我々はシロイヌナズナにおいて細胞外リガンドの受容体として機能することが知られている受容体キナーゼ群について，それぞれを植物培養細胞で個々に発現させた発現ライブラリーを作製し，ペプチドホルモン候補の網羅的な結合アッセイを行なった．その結果，すべての候補について，特異的な受容体が見つかった．すなわち，生理学的な解析を経ることなくペプチドリガンド–受容体ペアを見出すことができたのである．最終的には，両者の発現パターンや欠損株の解析を通して，これまで見過ごされていた新しいシグナリング系の発見へとつながった．本講演ではこの手法で見出されたペプチドホルモンの実例を紹介しながら，従来とは逆のアプローチによる「ものとり」の有効性について議論したい．

peptide hormone, receptor, Arabidopsis

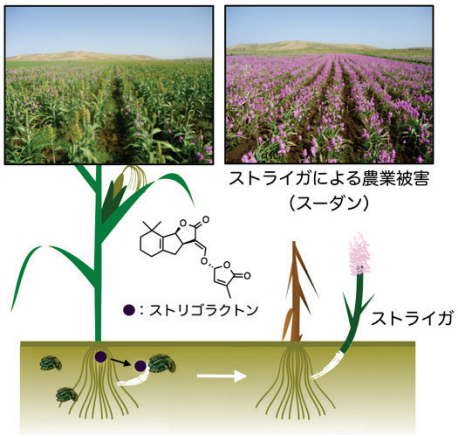
発表責任者：松林嘉克（matsu@bio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2CS02-2
講演日時、会場：3 月 16 日 15:35～ B03 会場

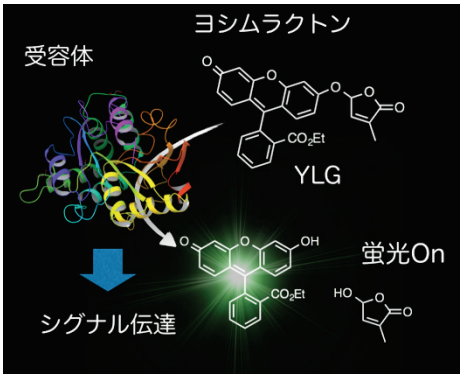
植物ホルモンシグナルの人工的制御

Artificial control of plant hormone signaling

○萩原 伸也（名大院理）
○Shinya Hagihara (Nagoya Univ.)



ストライガは、穀物の根に寄生して養分を吸い取り、収穫高を激減させる有害植物である。ストライガに汚染された土壌はアフリカのサハラ沙漠以南を中心に年々広がっており、その面積は 4 千万ヘクタール（日本の総面積に相当）にのぼる。これによる農業被害は年間 1 兆円を超えると見積もられ、アフリカの飢餓・貧困の要因の一つとなっている。ストライガを抑え、こうした土地を農地活用できれば、飢餓地域における作物生産量を向上し、世界的な食糧需給バランスの確保に大きく貢献すると考えられる。こうした背景のもと、私はストライガの発芽を選択的に抑える薬剤の開発を目指した。



ストライガ発芽機構の解明　通常の植物は季節や水分などを感じ取り発芽を開始する。これとは異なり、ストライガは寄生先となる穀物が土壌中に放出する植物ホルモン「ストリゴラクトン(SL)」を感知することで発芽する。このストライガ特有の仕組みを担うタンパク質は、ストライガ制圧に向けた分子標的の有力候補である。しかし、50 年以上もの間、このタンパク質「SL 受容体」は見つかっていなかった。私は、ストライガが SL を受容する際に加水分解するという現象に着目し、加水分解されると蛍光性を示す SL 様分子「ヨシムラクトングリーン（YLG)」を開発した。この分子を使うことにより受容活性の可視化が可能となり、世界に先駆けてストライガの SL 受容体の同定に成功した。さらに YLG を用いたライブイメージングにより、ストライガが発芽時にいつ・どこで SL を受容するのかを明らかにし、発芽機構の全容解明を大きく前進させた（*Science*, 2015)。

ストライガ発芽制御分子の開発　次に、SL 受容体に結合しストライガの発芽を制御する分子の開発に取り組んだ。YLG の蛍光を指標にすると、こうした分子を簡便に探索できる。実際に、SL 受容体による YLG 加水分解を阻害する分子を ITbM 化合物ライブラリーから探索したところ、複数のヒット化合物が得られた。このうち一つの化合物は、ストライガの発芽阻害効果が見られた。さらに、この化合物を誘導体化することで、より高活性な化合物が得られた。本ストライガ発芽阻害分子は、ストライガによる農業被害を抑え、食糧難地域に農地を回復する突破口になると期待されている。

plant hormone, strigolactone, high throughout screening

発表責任者：萩原伸也（hagi@itbm.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2CS02-3
講演日時、会場：3 月 16 日 16:00～ B03 会場

ジテルペン配糖体によるたんぱく質間相互作用の制御

Positive and negative control of protein-protein interactions by diterpene glucosides

○大神田 淳子（信州大農）
○Junko Ohkanda (Shinshu Univ.)

真菌類の 2 次代謝産物ジテルペン配糖体フシコクシン類(FC)は、顕著な植物ホルモン様活性を有する一方、その半合成誘導体は哺乳類細胞に対して増殖阻害活性を示すなど多様な生理活性を持つ。興味深いことに、FC の哺乳類細胞に対する活性の差異はジテルペン骨格の化学構造に帰着することが、これまでの我々の研究で明らかになっている。FC は植物由来の 14-3-3 たんぱく質と H^+-ATPase の双方に結合して両者のたんぱく質間相互作用(PPIs)を正に変調し、気孔の開閉運動の異常を誘導する分子機構が報告されているが、14-3-3 たんぱく質とはそもそも全ての真核細胞に発現する制御因子であることを踏まえれば、このことは FC が真核細胞におけるリン酸化信号伝達のグローバルな変調剤となり得ることを示唆するものにほかならない。近年、PPIs がポストゲノムの創薬標的として広く注目を集めている一方で、作用面が広く平坦であるなどの理由から低分子創薬は苦戦を強いられている。こうした背景のもと、優れた細胞透過性を持つ FC は、PPI 標的型創薬のシード化合物としての可能性が期待されるだけでなく、14-3-3 が制御する真核細胞内リン酸化信号伝達系を、特異的に正負に変調するための分子基盤としても魅力的である。我々はこうした FC の特性に着目し、これまでに FC 基盤型抗がん剤、PPI プローブ、PPI 阻害剤の開発を軸とするケミカルバイオロジー研究を推進してきた。1 例として、PPI 中分子薬のプロドラッグ化のアプローチとして、FC とペプチドフラグメントにそれぞれアルデヒド基とアミノオキシ基を導入した誘導体を設計し、内在性 14-3-3 を鋳型とするオキシム生成反応と、生成したオキシム体による 14-3-3PPIs の阻害を検討した。細胞内で発生した縮合体は顕著な細胞増殖阻害活性を示し、FLAG-14-3-3 安定発現株を用いた共免疫沈降実験により、縮合体が 14-3-3 と cRaf の相互作用を顕著に抑制することを明らかにした。細胞内リン酸化信号伝達系の制御における FC 誘導体の有用性と今後の課題ついて議論したい。

fusicoccin, 14-3-3, protein-protein interactions

発表責任者：大神田淳子（johkanda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2CS02-4
講演日時、会場：3 月 16 日 16:30～ B03 会場

タンパク質－生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発

Development of new chemical probes to analyze protein-bioactive ligand interactions

○北 将樹[1,2] ([1]名大院生命農、[2]JST さきがけ)
○Masaki KITA[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]PRESTO, JST)

生物活性物質（リガンド）に反応基と検出基を導入した誘導体（ケミカルプローブ）は、標的分子の同定や、結合位置の解析に用いられる。我々は、ピレン基を持つケミカルプローブとマトリックス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法（LA-LDI MS）を用いて、ラベル化ペプチドを選択的に検出し、標的タンパク質とリガンドの結合位置を高精細に解析する手法の開発を目指している。多環芳香族炭化水素であるピレンの 6 位にアミド基を導入した誘導体が、LA-LDI MS において高感度に検出されることを見出した［Sci. Rep. 2015, 5, 17853］。さらに、標的分子のラベル化向上を目指して、反応性官能基に N-ヒドロキシこはく酸（NHS）エステル基をもつ、顕著な抗腫瘍活性を示す海洋天然物アプリロニン A のアミドピレンプローブを合成した。本プローブを用いた標的分子アクチンのラベル化は、定量的に進行した。またその断片ペプチドの LA-LDI MS 解析から、リガンドの結合位置が複合体の X 線結晶構造と一致した［Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 8564］。今後は、本手法を用いて、炎症や痛み作用に関わる、トガリネズミやカモノハシといった哺乳動物由来の神経毒リガンドについても、標的分子の同定や機能作用点の解明を目指したいと考えている。

chemical probe, target identification, LA-LDI MS

発表責任者：北　将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2CS02-5
講演日時、会場：3 月 16 日 16:55～ B03 会場

GLUT4 の糖鎖機能を可視化する局在痕跡イメージングプローブ
Functional Clarification of N-Glycan of GLUT4 by MEMORY Imaging

○菊地 和也 [1,2] ([1] 阪大工、[2] 阪大免フロ)
○Kazuya Kikuchi[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]IFReC, Osaka Univ.)

蛋白質の動態は、細胞の生理機能の制御において極めて重要な役割を果たしている。Glucose transporter 4 (GLUT4) も細胞内動態が生体のホメオスタシスの維持に必須の蛋白質の一つである。GLUT4 は、N 結合型糖鎖を持つ膜蛋白質であり、インスリン刺激により、細胞膜に移行しグルコースを取り込むことが知られている。その細胞内動態の異常は２型糖尿病の原因となることから、動態機構の解明は生命科学・医学分野における大きな課題となっている。しかしながら、GLUT4 の N 結合型糖鎖は、細胞内動態への役割に関しては論争があり、明確に解明されていない。そこで、演者らが開発した蛋白質ラベル化法である PYP（Photoactive yellow protein）タグを用いたイメージング技術を応用して、GLUT4 の動態を可視化するとともに、N 結合型糖鎖の役割を調べた。

PYP は、紅色硫黄細菌由来の 125 アミノ酸からなる小蛋白質であり、桂皮酸／クマリン誘導体と特異的に共有結合することが知られている。これまでの研究において、PYP タグと目的蛋白質の融合蛋白質を細胞内に発現させ、PYP タグを介して目的蛋白質を特異的に蛍光標識しイメージングする技術を開発してきた。特に、遊離状態では非蛍光性で、PYP タグとの標識反応に伴い蛍光強度を上昇させる「発蛍光プローブ」を開発し、迅速かつ高い S/N 比で生細胞内の蛋白質を可視化することに成功している。本研究では、異なる波長の蛍光を発する複数の発蛍光プローブを用いることで、GLUT4 の動態の時空間イメージング技術の開発を行った。この技術を応用し、糖鎖形成阻害剤と GLUT4 糖鎖欠失変異体を用い可視化解析することで、GLUT4 の N 結合型糖鎖の細胞内動態における機能を明らかにした。

発表論文

Y. Hori, H. Ueno, S.Mizukami & K. Kikuchi, “Photoactive Yellow Protein-Based Protein Labeling System with Turn-on Fluorescence Intensity”, ***J. Am. Chem. Soc.***, 131, 16610-16611 (2009).
S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki & K. Kikuchi, “Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking”, ***Nat. Chem. Biol.***, 12, 853-859 (2016).

GLUT4, N-Glycan, PYP

発表責任者：菊地和也（kkikuchi@mls.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2CS02-6
講演日時、会場：3 月 16 日 17:25～ B03 会場

小分子化合物の新しい可能性：遺伝病治療や再生医療の実現に向けて

Therapeutic treatment of genetic diseases and regeneration medicine with small molecules

○萩原 正敏（京大医）
○Masatoshi Hagiwara (Kyoto Univ.)

近年、米国では、創薬シーズ発掘などの探索段階において、アカデミアが主導的役割を果たす創薬スタイルが主流となっている。これに対し、我が国では、依然として大手製薬企業が創薬の主たる担い手であるが、アカデミア創薬への期待は高まっている。細胞や生体に直接、新薬候補化合物を投与して効果を検討する表現型アッセイはアカデミアが得意な分野であるが、標的とする疾患の病態を反映する評価系を構築できれば、大手製薬企業などが行っている従来型の in vitro スクリーニングより、遥かに効率良く有望な化合物の活性を評価できる。例えば、我々はスプライシングなどの遺伝子発現過程を、蛍光・発光プローブによって生体内で可視化する独自技術を開発し、遺伝病などに対する創薬スクリーニングに応用している。遺伝病など難治疾患の治療法として、遺伝子治療や細胞治療などに俗世間の注目が集まりがちであるが、我々は小分子化合物による治療の可能性を独自の観点から追求し、筋ジストロフィーやライソゾーム病など、遺伝病に対する治療薬候補物質を見出しつつある。また、脳梗塞や神経変性疾患などに対する再生医療も、小分子で実現できる可能性が見出されている。ケミカルバイオロジーに立脚した新しい創薬手法とその今後の可能性について議論する。

参考文献

1. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M (2011) Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. Nature Communications 2, 308.
2. Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takauchi A, Hosoya T, Suzuki T, and Hagiwara M (2015) Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. Proc Natl Acad Sci USA. 112(9):2764-2769.
3. Nakano-Kobayashi A, Awaya T, Kii I, Sumida Y, Okuno, Yoshida S, Sumida T, Inoue H, Hosoya T, and Hagiwara M. (2017) Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. Proc Natl Acad Sci USA. 114(38):10268-10273.

chemical biology, genetic disease, regenerative medicine

発表責任者：萩原　正敏（office-hagiwara@anat1dadb.med.kyoto-u.ac.jp）

3月18日（日）13:00〜16:00

【産学官学術交流委員会企画シンポジウム】

4CS01　これからの産官学連携のあるべき姿は？　―産官学リーダーが語るオープンイノベーション―

3月18日（日）　13:00〜16:00　会場：共通講義棟北　1階　N101
世話人：松山　旭（キッコーマン㈱）

13:00　基調講演　「農業・食品産業には新たな「知」が求められている〜産業生態系の変容と農食イノベーション〜」
…… **妹尾堅一郎**（特定非営利活動法人 産学連携推進機構 理事長）

13:40　特別講演　「「知の集積と活用の場」を活用した産学官連携」
…… **別所　智博**（農林水産省大臣官房技術統括審議官，農林水産技術会議事務局長）

14:00　話題提供およびパネルディスカッション

モデレーター　妹尾堅一郎 ……（特定非営利活動法人 産学連携推進機構 理事長）
パネラー　別所智博 ……（農林水産省大臣官房技術総括審議官，農林水産技術会議事務局長）
辻村英雄 ……（サントリー食品インターナショナル㈱ 取締役副社長）
山下伸也 ……（日本水産㈱ 執行役員 中央研究所長）
折戸文夫 ……（三菱ケミカル㈱ 顧問）
西出　香 ……（TNO オランダ応用科学研究機構 日本代表）
山本貴史 ……（㈱東大 TLO 代表取締役社長）

講演番号：4CS01
講演日時、会場：3 月 18 日 13:00～ N101 会場

これからの産官学連携のあるべき姿は？－産官学リーダーが語るオープンイノベーション－

Towards Future Tripartite Collaboration

妹尾 堅一郎[1]、別所 智博[2]、山下 伸也[3]、折戸 文夫[4]、西出 香[5]、山本 貴史[6]、辻村 英雄[7]([1]特定非営利活動法人 産学連携推進機構、[2]農林水産省、農林水産技術会議事務局、[3]日本水産（株） 中央研究所、[4]三菱ケミカル（株）、[5]TNO オランダ応用科学研究機構、[6]（株）東大 TLO、[7]サントリー食品インターナショナル（株））

今から 100 年の時をふりかえり、日本の農林水産業、食品産業の歴史を見つめなおすと何が見えてくるだろうか。この産業の発展の裏には、消費者・生産者あるいは社会の要求等を科学的な視点からとらえ、その要求を現実化しようとする研究開発・技術開発そのもが基盤としてしっかりしていたことがよくわかる。いわば、学問と実践が一体となった「実学」の発展史であったとも言えるのではなかろうか。この実学を基本としつつ、産学官研究開発をたくみに取り入れて技術の社会実装を続けてきたのが、日本独特の学問領域である「農芸化学」ではあるまいか。「食のグローバル化」が進む現在、農林水産業・食品分野の国際競争力強化をより一層進めていくためには、化学産業、電気・電子産業等といった異分野との技術交流や、工学・理学・医学等の多様なアカデミアとの共同研究を通じて、革新的技術開発と新たな価値の創出、すなわちイノベーションを促進する産学官連携の姿が期待されている。

本シンポジウムは、農林水産業、食品産業、生活産業等におけるイノベーション創出活動にとって農芸化学がいかに重要か、アカデミアと産業界の間にどのような問題や課題があるのか、そして今後の産学官連携のあり方はどうあるべきか、等々について議論する起点づくりとして開催いたします。

シンポジウムでは３部で構成します。まず、産学連携機構理事長の妹尾堅一郎先生に「産業生態系の変容とイノベーション」に関する基調講演、続いて農林水産省の新たな取組みである「知の集積と活用の場」を活用した産学官連携による社会実装に関する特別講演、そして、食品産業、化学産業のトップや国内外の産学官関係者によるパネルディスカッションを行います。これらを通じて、学会会員の皆様が考察すべき論点を抽出し、今後の議論の起点づくりができればと考えております。皆さまの参加をお待ちしております。

Tripartite, Open Innovation

発表責任者：松山　旭（amatsuyama@mail.kikkoman.co.jp）

ランチョンシンポジウムプログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，名城大学 共通講義棟北１階出入口ロビー「ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムチケット配布デスク」にて開催日当日，8:15 より配布します．チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットを受け取り，開始５分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3 月 16 日(金) 12:30〜13:40

2LS01　農学って，なあに？　―農学教育の未来ビジョン―

主　催：日本農芸化学会 JABEE 対応委員会
協　賛：公益財団法人農学会
3 月 16 日（金） 12:30〜13:40　A23 会場（共通講義棟北　3 階　N324）
世話人：江坂宗春（広大院生物圏科学），小原章裕（名城大農）
座　長：中島春紫（明治大農），小原章裕（名城大農），大島敏久（大阪工大工）

12:30　2LS01-1　**農学教育の未来ビジョン**……○江坂宗春（広島大生物圏科学）
12:40　2LS01-2　**高大接続と農学教育**……○山本廣基（大学入試センター理事長, 元島根大学長）
13:00　2LS01-3　**人材育成の視点と実践**……○山下興亜（中部大名誉学事顧問, 前中部大学長, 元名大副総長）
13:20　2LS01-4　**農学教育の課題と将来展望**……○渡部終五（北里大海洋生命, JABEE理事, 東大名誉教授）
13:40　**閉会挨拶**……野尻秀昭（東大生物生産工学研究セ）

3 月 17 日(土) 12:30〜13:30

3LS01　男女共同参画ランチョンシンポジウム（フォーラム）「いろんな話を聞いてみよう，しゃべってみよう」

主　催：日本農芸化学会 男女共同参画委員会
後　援：男女共同参画学協会連絡会
3 月 17 日（土） 12:30〜13:30　会場：6 号館　1 階　食堂

12:30　**開会の挨拶**……熊谷日登美（日本大学生物資源科学部）

12:40　3LS01-1　**シングルマザーの研究生活**……伊藤美環子（農研機構 北海道農業研究センター）
シングルマザーとして２人の子供の子育てをしながら研究を続けられた要因を振り返り，直面した問題や利用した制度，工夫していた事などについてお話したいと思います．

3LS01-2　**働きやすい職場とは ―多様性について考える―**……青木里奈（㈱カネカ）
みんなが働きやすい職場をつくるにはどうしたら良いのか？ 育休からの職場復帰を控える今の私の考えをお話ししたいと思います．

3LS01-3　**男性研究者とワークライフバランス**……中村英光（東京大学大学院農学生命科学研究科）
ポスドク時代に二児を授かり，妻と共働きで今も子育てに奮闘中．研究との両立の上での苦労や工夫したことをお話しします．

3LS01-4　**環境変化を楽しむセルフイノベーション**……金岡香之子（アステラスファーマテック㈱）
組織人として，色々な場面に遭遇してきた経験をふまえ，これらの状況を上手く活用し，自分らしく変化し続ける楽しみ方をお話し出来ればと思います．

3LS01-5　**山あり谷ありの中で，成長を信じる**……大田ゆかり（海洋研究開発機構）
思うように研究の時間が取れないとき，その時々に出来ることをやりながら，その先を考える方法もあるかも知れません．

3LS01-6　**企業で研究者として働きながら考えていること**……石本容子（第一三共㈱）
就職した理由や企業と大学での研究の違い，現在試行錯誤中の仕事・家事・育児の両立について，ざっくばらんにお話しします．

3LS01-7　**子育てしながらの公募，教育・研究生活について**……齊藤安貴子（大阪電気通信大学工学部）
子育てしながら経験した教員公募・保育園探し，現在の教育・研究生活において好きな研究を続けるための戦略について語ります．

3LS01-8　**企業研究の面白さ**……堤　浩子（月桂冠㈱）
企業のモノづくりで，研究開発が面白い時もあれば，壁にもぶつかります．人とのつながりの楽しさや仕事の面白さについてお話します．

3LS01-9　**研究を職業として選ぶ人生とは？**……古園さおり（東京大学生物生産工学研究センター）
研究を職業として選んだ私のこれまでの人生の中で，思ったこと，悩んだこと，気付いたことなどお話ししてみたいと思います．

3LS01-10　**北欧外資系企業での研究開発に携わって**……松井知子（ノボザイムズ ジャパン㈱）
デンマーク企業の日本の研究所というちょっとレアな場所での仕事と子育ての経験から感じたこと（日本との相違点，類似点など）

13:25　**閉会の挨拶**……熊谷日登美（日本大学生物資源科学部）

3月17日(土) 12:30〜13:30

3LS02　BBB　ランチョンセミナー　「オープンサイエンス」〜成果をもっと形に，そして業績に.

研究者が常に意識する，英語での論文執筆，投稿そして発表．論文をどこにいくつ出したかは，特にアカデミックな業績評価においてあいかわらず最も重視されています．成果を論文として完成させ，発表することの重要性は，もちろんこの先も変わることはないでしょう.

一方で，情報の公開とアクセスの手段に大きな変革が起こった現代において，研究成果の公開方法にも新しい動きが始まっています.「オープンアクセス」の概念が拡張した「オープンサイエンス」への取り組みは，ここ数年で欧米を中心に急速な広がりをみせています．論文をできるだけオープンにすることに加えて，論文化の見込みが立たないデータも含め，研究成果をより広く，より分かりやすく社会で共有するシステムをつくろう，そしてそれを活用することで革新的な科学を育む基盤を築こう，という発想です.

データのオープン化は，その社会における有効活用を可能にするだけでなく，従来の論文執筆ひいては業績評価のあり方にも影響を及ぼす可能性があります．たとえば，中核的なデータやアイディアは，その先取性が担保されるのであれば，むしろ論文執筆を待たずに公開した方が有利である，そんな考え方も出てくるかもしれません．これは，研究の現場で実際にデータを出している研究者の方々にも少なからず関係しそうです.

本セミナーでは，内閣府ならびに文部科学省において日本のオープンサイエンス政策に携わる，林 和弘 氏をお招きし，その動向について解説していただきます．林氏は，東大理学部の有機合成化学分野のご出身で，自ら学術ジャーナルの電子化に携わった経験をお持ちです．新しい時代に，自らの成果を如何に発表して活動を展開するか？農芸化学の将来を担う皆さんと一緒に考える機会にしたいと思います.

主　催：日本農芸化学会英文誌編集委員会
世話人：上田賢志（日本大学生物資源科学部），鈴木義人（茨城大学農学部）
日　時：2018年3月17日（土）　12:30〜13:30
会　場：A23会場（名城大学　共通講義棟北3階　N324）

12:30〜12:35　**開会の挨拶** ‥‥‥

講演番号：2LS01-1
講演日時、会場：3 月 16 日 12:30～ A23 会場

農学教育の未来ビジョン
Future vision of agricultural education

○江坂 宗春 (広島大生物圏科学)
○Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

日本技術者教育認定機構 JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、国際的に通用する技術者の育成のため、技術者教育の振興、大学や高専の技術者教育プログラムの審査・認定を行う一般社団法人である（http://www.jabee.org を参照）。

日本農芸化学会は、JABEE 対応委員会を組織し、農学系 17 学会が加盟する公益財団法人農学会技術者教育推進委員会のもとで、JABEE 農学一般関連分野の審査に加わるとともに、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、JABEE 講習会や JABEE 普及指導活動等を行っている。

また、JABEE 対応委員会は、全国大会時に、以下のような教育シンポジウムを開催してきている。

・2007 年度「日本農芸化学会と JABEE」
・2008 年度「農芸化学における魅力ある大学教育と JABEE」
・2009 年度「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
・2010 年度「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
・2011 年度「JABEE とキャリア教育」（東日本大震災で中止）
・2012 年度「農芸化学における人材育成」
・2013 年度「大学・大学院での教育改革と人材養成」
・2014 年度「農学系人材養成に関する最近の取り組みについて」
・2015 年度「グローバル人材育成と教育改革」
・2016 年度「技術者・研究者人生における技術士資格の意義とメリット」
・2017 年度「農芸化学における技術者教育、技術士養成」

現在、農芸化学会の JABEE 対応委員会は、JABEE に特化するのではなく、広く農学・農芸化学教育の推進をはかる委員会として位置付ける方向で検討している。一方、親委員会である農学会技術者教育推進委員会も、JABEE の推進や審査だけでなく、広く農学教育の推進、未来ビジョンについても所掌する委員会とし、委員会名も、農学教育推進委員会（案）に変えることを検討している。

このような背景の中、今回のシンポジウムは、「農学って、なあに？ -農学教育の未来ビジョン-」とし、長年、農学教育に関わり、ご活躍した先生方に、農学教育について語っていただくとともに、農学教育がどうあるべきか、農学教育の未来ビジョンについても提言してもらう。そして、農学における教育の質保証を担保しながら、有能な人材を育成するための方策について討論したい。

JABEE, agriculture, agricultural education

発表責任者：江坂宗春（mesaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2LS01-2
講演日時、会場：3 月 16 日 12:40～ A23 会場

高大接続と農学教育

Articulation Reforms of High Schools/Universities and Agricultural Education

○山本 廣基 ((独)大学入試センター)
○Hiroki Yamamoto (National Center for University Entrance Examinations)

＜今般の改革の背景＞

高大接続改革については、現行の大学入試センター試験が導入される契機となった 1985 年の臨時教育審議会答申以来、高等教育のマス段階からユニバーサル段階に入った時代における大学入試の在り方として長らく議論されてきた課題である。今般、改めて、教育再生実行会議の第四次提言、中央教育審議会高大接続特別部会の答申、高大接続システム改革会議の「最終報告」を経て、平成 29 年 7 月 13 日に「高大接続改革の実施方針等の策定について」が発表された。これらの提言、答申、報告等はいずれも、高等学校教育、大学教育およびそれらを接続する大学入学者選抜を一体的に改革するというものである。

＜一体的改革＞

高等学校教育改革では「学修指導要領の抜本的な見直し」、「学習・指導方法の改善」、「多面的な評価の推進」が、大学教育改革においては「個々の授業科目等を越えた大学教育全体としてのカリキュラム･マネジメントを確立」、「アクティブ・ラーニングへの質的な転換」、「認証評価制度の改善」を行い、入学者選抜においては、「記述式問題、マーク式問題の改善などを含む共通テストの導入による思考力・判断力・表現力の一層の重視」、「個別入学者選抜においても、多面的・総合的に評価する選抜へ改善、調査書の改善や学修計画書等の充実」を目指すとしている。

この講演では、今般の高大接続改革のアウトラインと今後のスケジュールに触れた後、改革によって何が求められているのか、それに伴って大学教育がどのように変わっていくことが期待されているのか、併せて、大学における農学教育の質保障をどのようにしていくのか、などについて私見を述べることとしたい。

articulation reforms, admission, curriculum

発表責任者：Yamamoto, Hiroki（h_yamamoto@cen.dnc.ac.jp）

講演番号：2LS01-3
講演日時、会場：3 月 16 日 13:00～ A23 会場

人材育成の視点と実践

A critical view and attempts for the higher education in agricultural sciences

○山下 興亜（中部大学）
○Okitsugu Yamashita (Chubu University)

大学における人材育成は、基本的には社会の未来を決める事業であり、個人的な良心と正義に裏打ちされた組織的で体系的な仕組みと内容によって運営される極めて人間的な活動である。今日の我が国を代表する企業や学界の反社会的な不始末の実例を挙げ、ここから大学における人材育成のあり方や方法を再考する糸口にしたい。今日のこの社会的な劣化は、ひとえに管理者、責任者の公に対する認識不足、共に対する思慮不足、人間性の浅薄さによるところが大であると言えるが、大学教育と無縁ではない。

このような人材を育成したのは大学であり、大学教育のなせるところである。勿論、職業人としての個人の成長は、それぞれの実践的な仕事を通しての訓練や学習の積み重ねによってなされるので、個別の職業教育は大学教育の守備範囲には含まれない。それは、今日では職種や専門知識・技術の有効期間、寿命が短く、一生のうちに複数回の転職もありうるからである。

今日の大学教育に求められている基本的な事柄は、社会の多様な展開と持続的な発展を進めるための知性の育成である。既存の知識や技術の修得を超えた、知の消費者ではなく生産者としての知識基盤社会を先導する知的創造能力の育成である。そのためには、教員が日常の教育研究活動を通して自らの教育観なり教育論を発展させ続けることであろう。

これまでの昆虫研究を通して発想した私の教育論を３つの事例から紹介する。

１つは、カイコの休眠研究から学んだ「競争（動）」と「共生（静）」の時間軸での統合による生命と社会の持続的発展性についてである。

２つは、ミツバチの情報学習活動から見える「はみだし個体」の未来開拓機能についてである。規格化された画一的な教育の限界と個別能力の開拓を知ることである。

３つは、同じくミツバチの発育状態に応じた仕事の創出と活用についてである。無業も失業もない本物の適材適所の人材登用のあり方である。

この教育論の実践については、①個別授業での知的な回路の活性化、②教育組織体制の改善での縦断細分化型体制から横断包括型体制（大学科制）への変更、③教育の場の学外への拡大による臨場教育の導入があげられる。学外教育については、具体的には①商工会議所との連携協定による「報酬型インターンシップ」の実施であり、②「リスク予防管理師」（学内資格）の養成を通して学士力の向上を図っている。

higher education, agricultural sciences

発表責任者：山下　興亜（okitsugu@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2LS01-4
講演日時、会場：3 月 16 日 13:20～ A23 会場

農学教育の課題と将来展望

Challenges and perspectives of education for agricultural sciences

○渡部 終五（北里大海洋生命）
○Shugo Watabe (Kitasato Univ.)

わが国では教育改革の名の下、1890 年代以降に高等教育機関の農学系の学部や学科が改組、転換された。すなわち、農学系分野では、基本分野に基づく学科体制、教育分野の転換とともに学部名称、学科名称が大きく変更され、生物生産、生物環境、生物資源、応用生物などが使われ出し、「農」や「産」の文字が大きく減少した。この背景には、教育改革といいながらも、当時の多くの入学希望あるいは進学希望の学生がこれらの文字を「泥臭い」として敬遠したことにもよる。この感覚は当時に始まったことではなく、わが国が高度成長期を迎えて第一次産業の価値が相対的に低下してきたころから生じてきたものと思う。また、近年、高校生の大学進学率が 50%を越えてユニバーサル化され、交通手段や情報通信技術の発達により国際的にも多くの情報がほぼ瞬時に共有化される状況、すなわちグローバル化の時代を迎え、その中で「農学」の意義や存在感を示すことができなかったことも大きな要員であろう。現在、「農」あるいは「産」を復活させる動きも一部ではみられるが、大勢は変わっていない。しかしながら、農学分野は決して取り残された学問分野ではなく、人類の福祉のための「食料」、「環境」、「生命」の課題解決を担う重要な学問分野である。

日本学術会議では農学委員会・食料科学委員会合同農学分野の参照基準検討分科会を設置し、2015 年 10 月に報告「大学教育の分野別質保証のための教育課程編成上の参照基準：農学分野」を発出した。この報告では、農学の定義に始まり、固有の特性、学生が身に付けることを目指すべき基本的な素養、学修方法および学修成果の評価方法に関する基本的な考え方、市民性の涵養をめぐる専門教育と共用教育との関わり、を内容としている。さらに、農学の基本分野を、農芸化学、生産農学、畜産学・獣医学、水産学、森林学・林産学、農業経済学、農業工学と定義し、「農」および「産」の文字を各分野とも万遍なく使用している。農学分野が固有の特性をもつためには、1980 年代以前の体系が重要との認識が感じられる。この上で、時代の変化にどのように対応するのか、グローバル化社会で農学に特有な地域性の視点をどのように担保するかが議論され、そのための教育指針が示されている。

農学（水畜産も含む）は農業と密接に関連する学問分野であることは自明の理であるが、教育もその視野が必要である。日本技術者教育認定機構（JABEE）が推進する技術者教育プログラムはこの目的を実践するための一つの有力な手段である。研究教育に多忙な高等教育機関のスタッフには大変な仕事となるが、エンジニアリングデザインへの取組みを農学と農業を結びつける一つの方法と考えることはできないであろうか。これが農学を復活させる効果的なステップとならないであろうか。

education for agricultural sciences, category-dependent quality assurance, professional education

発表責任者：渡部終五（swatabe@kitasato-u.ac.jp）

ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，セミナー開催当日の朝に，名城大学共通講義棟北 1 階出入口ロビー「ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムチケット配布デスク」にて配布します．配布時間は，3 月 16 日，17 日とも 8:15〜10:15 です．

チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットをお受け取り下さい．

チケット配布は，定員に達した時点で終了します．

チケットは，12:30 を過ぎると無効になります．その後はチケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

3 月 16 日（金）　12:30〜13:20

LS 1-1　ポッカサッポロフード & ビバレッジ株式会社　　A20 会場（共通講義棟　北館 3F　N321）

司会：大橋 誠（ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社）

60 年目のチャレンジ！新たな時代に向けたポッカレモンの研究戦略

1. ポッカレモンの事業と研究の歴史

平山 梯也（ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社）

2. 最新　レモンの健康機能研究 〜ロコモティブシンドロームとレモン〜

瀬川 修一（サッポロホールディングス株式会社）

LS 1-2　日清食品ホールディングス株式会社　　B04 会場（共通講義棟　南館 2F　S201）

司会：田辺 創一（日清食品ホールディングス株式会社）

食品成分による皮膚状態改善

1. 食品成分による「しみ」改善のストラテジー

安藤 秀哉（岡山理科大学工学部）

2. 乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* N320 株の皮膚状態改善効果

砂田 洋介（日清食品ホールディングス株式会社）

LS 1-3　東ソー株式会社　　B05 会場（共通講義棟　南館 2F　S202）

血清糖タンパク質由来マクロファージ活性化剤の創製と免疫療法への応用

宇都 義浩（徳島大学大学院社会産業理工学研究部）

LS 1-4　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　　B06 会場（共通講義棟　南館 2F　S203）

質量分析計の応用分野を広げる最新ソリューション

1. ZipChip を用いたアミノ酸・ペプチド・インタクトタンパク質迅速簡便分析

高原 健太郎（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

2. MS でタンパク質の構造に迫る　〜Native MS とクロスリンキング MS〜

高原 健太郎（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

LS 1-5　株式会社 明治　　B07 会場（共通講義棟　南館 3F　S301）

座長：松田 幹（名古屋大学大学院生命農学研究科）

新規測定法開発が切り開いたアレルギーの新パラダイムと展望

―経口免疫寛容を導く Low affinity IgE と High affinity IgE が誘発する食物アレルギー―

木戸 博（徳島大学先端酵素学研究所）

LS 1-6　SCIEX　　B08 会場（共通講義棟　南館 3F　S302）

司会：建田 潮（SCIEX）

過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）の質量分析

仲川 清隆（東北大学大学院農学研究科）

3月17日（土） 12:30〜13:20

LS 2-1　日東薬品工業株式会社　　A20 会場（共通講義棟　北館 3F　N321）

座長：小川 順（京都大学大学院農学研究科）

腸内細菌の捧げ物
〜ポストバイオティクス®が拓く未来〜
乳酸菌が生産する不飽和脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性

松井 英則（北里大学北里生命科学研究所）

LS 2-2　味の素株式会社　　B04 会場（共通講義棟　南館 2F　S201）

記憶が形づくる香りの知覚
〜ヒトの脳からみた食品研究

岡本 雅子（東京大学大学院農学生命科学研究科/ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト）

LS 2-3　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　　B05 会場（共通講義棟　南館 2F　S202）

実践！ 定量ウェスタンブロッティング
定量性の高いウェスタンデータの取得とより正確なデータ補正

中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）

LS 2-4　長良サイエンス株式会社　　B06 会場（共通講義棟　南館 2F　S203）

司会：中塚 進一（長良サイエンス株式会社）

天然物化学の研究過程で得た独自技術の紹介
〜高性能 HPLC 担体，高純度試薬の開発，UV エンド吸収による HPLC 分析，LC/MS/MS，NMR 分析の工夫〜

中塚 進一，松本 恵実，中塚 宏志（長良サイエンス株式会社）

LS 2-5　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　　B07 会場（共通講義棟　南館 3F　S301）

座長：宮澤 陽夫（東北大学）

新規機能性食品としての卵殻膜の腸炎抑制作用とマルチオミクス解析

加藤 久典（東京大学大学院農学生命科学研究科）

LS 2-6　株式会社島津製作所　　B08 会場（共通講義棟　南館 3F　S302）

司会：渡邉 淳（株式会社島津製作所）

島津製作所の最新分析ソリューションのご紹介
1. 食品分野における LC/MS/MS メソッドパッケージの分析例

中西 豪（株式会社島津製作所）

2. 細胞培地分析プラットフォーム：C2MAP システムのご紹介

豊田 健一（株式会社島津製作所）

日本農芸化学会　2018年度大会
ランチョンセミナー プログラムNo.LS1-1

おいしい「！」がある
pokka sapporo

- 日時　2018年3月16日（金）12:30～13:20
- 場所　A20会場（名城大学 共通講義棟 北館3F N321）

60年目のチャレンジ！
新たな時代に向けたポッカレモンの研究戦略

講演1

ポッカレモンの事業と研究の歴史

ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社
研究開発本部　本部長　平山 悌也

1957年に発売したポッカレモンは1972年に果汁100%となり、1990年代には用途別タイプの発売など時代のニーズに合わせて変化しました。またレモンの収穫後丁寧に搾汁したおいしさが評価され、発売以来60年にわたるロングセラー商品に成長しております。本日はポッカレモンの歴史と弊社のレモン研究の内容を紹介します。

講演2

最新 レモンの健康機能研究
～ロコモティブシンドロームとレモン～

サッポロホールディングス株式会社　グループR&D本部
価値創造フロンティア研究所　瀬川 修一

ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社は2013年2月より広島県とパートナーシップ協定を締結し、この連携の一環として、これまで県立広島大学や広島県立総合技術研究所と共にレモンに関する様々な研究を進めてきました。その中で、レモンを日常生活に取り入れることにより、骨の健康によい影響を及ぼす可能性を検討してきました。骨密度が低下傾向にある年代層において、レモン1個分の果汁とカルシウムを含む飲料を1日1本摂取することにより、骨密度の増加が確認されました。今回の研究では、普段の食生活においてカルシウムを含むレモン果汁を摂取することで、骨の健康増進につながる可能性を示しています。

日本農芸化学会2018年度大会

日清食品ホールディングス株式会社 ランチョンセミナー　LS1-2

食品成分による皮膚状態改善

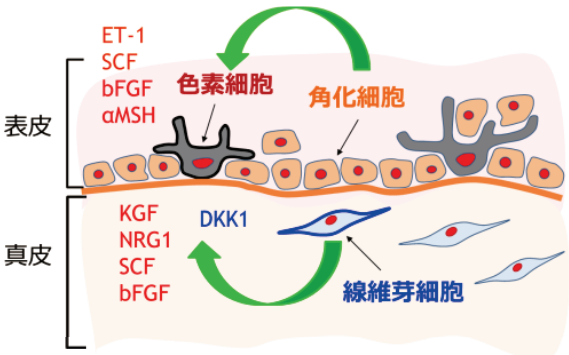
日時：3月16日(金) 12:30 ～ 13:20
会場：B04会場(名城大学共通講義棟南館 2F S201)

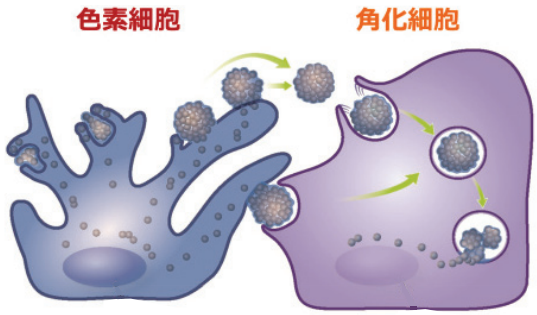
1. 食品成分による「しみ」改善のストラテジー

安藤 秀哉 先生

岡山理科大学 工学部 バイオ・応用化学科 教授

ビタミンCやEなど果実や植物油脂に多く含まれる抗酸化成分を摂取すると「しみ」が改善されることが知られている。赤ワインに含まれるレスベラトロールなどのポリフェノールにも同様な効果が見出されている。また、必須脂肪酸のリノール酸を塗布することで「しみ」が改善されるという報告もある。このように、種々の食品成分に「しみ」を改善する効果が認められている。メラニンは皮膚を守る大切な存在であるが、老齢になると色素細胞から過剰なメラニンが生成されて「しみ」となることがある。「しみ」を改善する有効成分の作用メカニズムとして、色素細胞がつくる過剰なメラニンの生成を抑制する、色素細胞から表皮角化細胞へのメラニンの移送を抑制する、表皮ターンオーバーを促進してメラニンを皮膚外部へ垢と一緒に排泄するなどが挙げられる。最近では、オートファジーや、表皮・真皮間の情報交換など、新しいコンセプトも登場している。本発表では、これまでに報告されてきた「しみ」改善策を紹介すると共に、その研究開発の中で明らかにされてきた食品由来有効成分のメラニン生成抑制作用メカニズムについて解説する。





安藤先生略歴

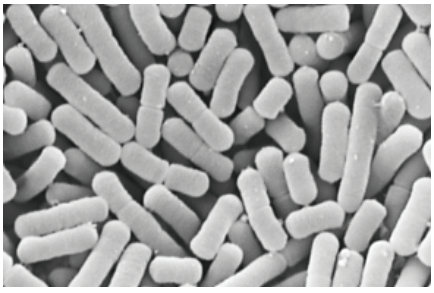
1983年	名古屋大学農学部畜産学科卒業、1995年 神戸大学 学位取得(論文博士) 博士(医学)
1983年～2011年	化粧品会社研究員、2002年～2003年 米国国立保健研究所(NIH) リサーチフェロー
2007年～2011年	同志社大学スキンエイジング・アンド・フォトエイジングリサーチセンター(寄付講座) 准教授
2011年～	岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科 教授

2. 乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* N320 株の皮膚状態改善効果

砂田　洋介

日清食品ホールディングス株式会社　健康科学研究部

弊社では皮膚状態改善効果の高い乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* N320株を選抜しました。本セミナーではN320株の効果をヒト試験にて検証した結果を中心に紹介させていただきます。



司会：　田辺　創一　日清食品ホールディングス株式会社　健康科学研究部

NISSIN 日清食品ホールディングス

The 2018 Annual Meeting of The Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry

日本農芸化学会 2018 年度大会

東ソー ランチョンセミナー

プログラムNo. **LS1-3**

演 題

血清糖タンパク質由来マクロファージ活性化剤の創製と免疫療法への応用

日 時

2018年 3月16日(金)

12:30 - 13:20

会 場

B05会場

(名城大学 天白キャンパス 共通講義棟 南館2F S202)

演 者

宇都 義浩 先生

(徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域 教授)

現在、第4の癌治療法として免疫療法が大変注目されている。免疫療法は主に、Tリンパ球やNK細胞、樹状細胞といった免疫細胞を活性化させる細胞療法と、抗原提示能を有するがんペプチドやアジュバントを投与する薬物療法に大別される。我々は、自然免疫の主要なプレーヤーであるマクロファージに着目し、血清糖タンパク質Gc proteinが生体内で糖鎖修飾されて生成するマクロファージ活性化因子(GcMAF)について、GcMAFの糖鎖構造とマクロファージ貪食活性化能や抗腫瘍活性との関係を明らかにしてきた。また、ヒト血清を単離して人工的にGcMAFに変換して患者に投与する“血清MAF療法”を考案し、1600症例を超える癌患者の治療を行ってきた。

一方、腸管免疫系は最も大きな免疫系で免疫系全体の約60%の細胞や抗体から構成されており、経口摂取された食物や病原菌に対する免疫反応を担っていることが知られている。そこで、経口摂取が可能なマクロファージ活性化剤“初乳MAF”を開発し、初乳MAFが腸管マクロファージの貪食能を活性化することや抗アレルギー作用を有することを明らかにしている。なお、本講演では、GcMAFの基礎と臨床に加えて東ソー株式会社のトヨパールを活用したGc proteinの分離精製および酵素による活性化についても紹介する。

東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部
TOSOH

本 社／〒105-8623 東京都港区芝3-8-2 芝公園ファーストビル
TEL 03-5427-5180 FAX 03-5427-5220
大 阪 支 店 ☎ (06) 6209-1948 名古屋支店 ☎ (052) 211-5730
福 岡 支 店 ☎ (092) 781-0481 仙 台 支 店 ☎ (022) 266-2341
山口営業所 ☎ (0834) 63-9888
http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/

C1712GX.A

thermo scientific

日本農芸化学会2018年度大会 ランチョンセミナー LS1-4

質量分析計の応用分野を広げる最新ソリューション

日 時　2018年3月16日(金) 12:30〜13:20

会 場　B06会場(名城大学　共通講義棟南館2F S203)

演 者　高原　健太郎
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー&MS事業部　マーケティング部

近年の質量分析計(MS)の進歩は目覚ましく、高感度・高速・高解像度でデータが取得できるようになりました。一方で、専門技術と思われがちなMSがより多くの研究者に利用されるよう、操作性の向上や幅広いアプリケーションへの応用も進んでいます。
本セミナーでは操作性の向上という観点からアミノ酸やタンパク質を迅速かつ簡便に分析できるポータブルキャピラリー電気泳動908 Devices™ ZipChip™システムおよびMSの応用事例の観点からNative MSとクロスリンキングMSによるタンパク質相互作用解析のワークフローと測定事例をご紹介します。
本セミナーでは、これから質量分析装置の導入を検討される研究者のみなさまに、最新の分析技術、および解析ワークフローについての情報をご提供します。

— ZipChipを用いたアミノ酸・ペプチド・インタクトタンパク質迅速簡便分析

キャピラリー電気泳動(CE)は、従来のLCで分離が困難な親水性化合物の分析の解決策の一つです。しかしながら、CE/MSとして用いた場合、その取り扱いの煩雑さが課題でした。ZipChipシステム※はCEとエレクトロスプレーイオン化(ESI)を単一のマイクロ流体装置に統合しており、簡便にMSに接続してさらに煩雑な操作なしにデータを取得可能です。消耗品であるチップおよびバッファーもキット化されており、安定かつ簡便に運用できます。2分程度で実施できる必須アミノ酸の高速分析や、抗体のチャージバリアントの高速分離など低分子から高分子までの実測例をご紹介します。

※ZipChipシステムは当社の質量分析計にのみ接続可能です。

— MSでタンパク質の構造に迫る　〜Native MSとクロスリンキングMS〜

タンパク質構造の分析手法として、X線結晶解析、NMR、またノーベル化学賞の受賞でますます注目を浴びているクライオ電子顕微鏡法に加え、最近ではMSも解析ツールの一つとして活用されるようになってきました。ネイティブ状態のタンパク質複合体を検出するNative MSの分析例や、クロスリンキング試薬とMSを利用して相互作用解析を行うクロスリンキングMSのワークフローと解析事例をご紹介します。

© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS146_A1712SO
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com
facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP
www.thermofisher.com

ThermoFisher SCIENTIFIC

明日をもっとおいしく
meiji

日本農芸化学会 2018 年度大会
ランチョンセミナー（LS1-5）

新規測定法開発が切り開いた アレルギーの新パラダイムと展望

― 経口免疫寛容を導く Low affinity IgE と High affinity IgE が誘発する食物アレルギー ―

2018 年 3 月 16 日（金）12：30 ～ 13：20
会場：B07 会場（名城大学 共通講義棟 南館 3F S301）

先進国で増加傾向を示している乳幼児の食物アレルギーの原因が、これまで信じられていたアレルゲン経口摂取によるものではなく、湿疹などを原因とする経皮感作によることが最近証明された。これにより、離乳食の開始を遅らせる従来の食物アレルギーの予防法とは逆に、離乳早期からアレルゲンを摂取することで食物アレルギーが予防できることが発表され、国内外で注目されている。しかし最近の減感作療法医療事故が示すように、離乳早期からのアレルゲン摂取の可否や、そのタイミングを医療現場でどのように判定したらよいか手探り状態にある。

我々は新たに開発した高感度 DCP（Densely Carboxylated Protein）チップ法で、微量の血液でイムノグロブリンクラススイッチのモニターと IgE 抗体の抗原親和性の測定を可能にした。その結果、ヒト IgE には Low affinity と High affinity IgE の 2 種類のサブタイプのあることが明らかになり、これまでの測定方法では検出できなかった Low affinity IgE が、経口免疫寛容の成立に深く関与していること等、アレルギー免疫学の新たな扉を開く可能性が示唆されている。本セミナーでは、DCP チップ法が切り開いた抗原親和性の異なる IgE 抗体の生理的・病態学的意義について、最新知見を紹介したい。

講師 木戸 博 先生
徳島大学特任教授・名誉教授 先端酵素学研究所

座長 松田 幹 先生
名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授



木戸 博 先生 略歴

1973 年弘前大学医学部卒、1977 年徳島大学大学院医学研究科生理系専攻博士課程終了、同医学部附属病院医員。1979 年米国ロッシュ分子生物学研究所 研究員を経て、1981 年徳島大学助手。1989 年同助教授を経て 1993 年徳島大学教授に就任。
2007 年～ 2011 年、徳島大学疾患酵素学研究センター長、徳島大学役員参与（研究担当）、2013 年徳島大学疾患酵素学研究センター特任教授（名誉教授）、2016 年同先端酵素科学研究所（特任教授）就任、現在に至る。
日本生化学会（永年会員・評議員）、International Proteolysis Society (President 2009-2011, Vice President 2001-2005)、日本病態プロテアーゼ学会（理事、評議員）、日本界面医学界（理事、評議員）、日本アレルギー学会、日本ワクチン学会、日本感染症学会に所属。専門は生化学、分子生物学。

共催：株式会社 明治

日本農芸化学会 2018年度大会

[SCIEX共催] ランチョンセミナー

有機化合物の分析に必要不可欠なツール、質量分析装置。
その活用分野は、創薬研究、タンパク質や脂質などの生体成分の研究開発、
食品中の残留農薬試験や機能性成分についての研究など、
あらゆるアプリケーションに広がりを見せています。
本セミナーでは、東北大学大学院農学研究科 教授 仲川清隆先生より
SCIEX 独自のイオントラップを使用した質量分析による過酸化脂質の分析例を
紹介いただきます。またイオンモビリティー機能を有した QTRAP 6500+ SeleXION による
解析も紹介いただきます。質量分析を活用した先端の研究に触れるまたとない機会です。
ぜひご参加ください。

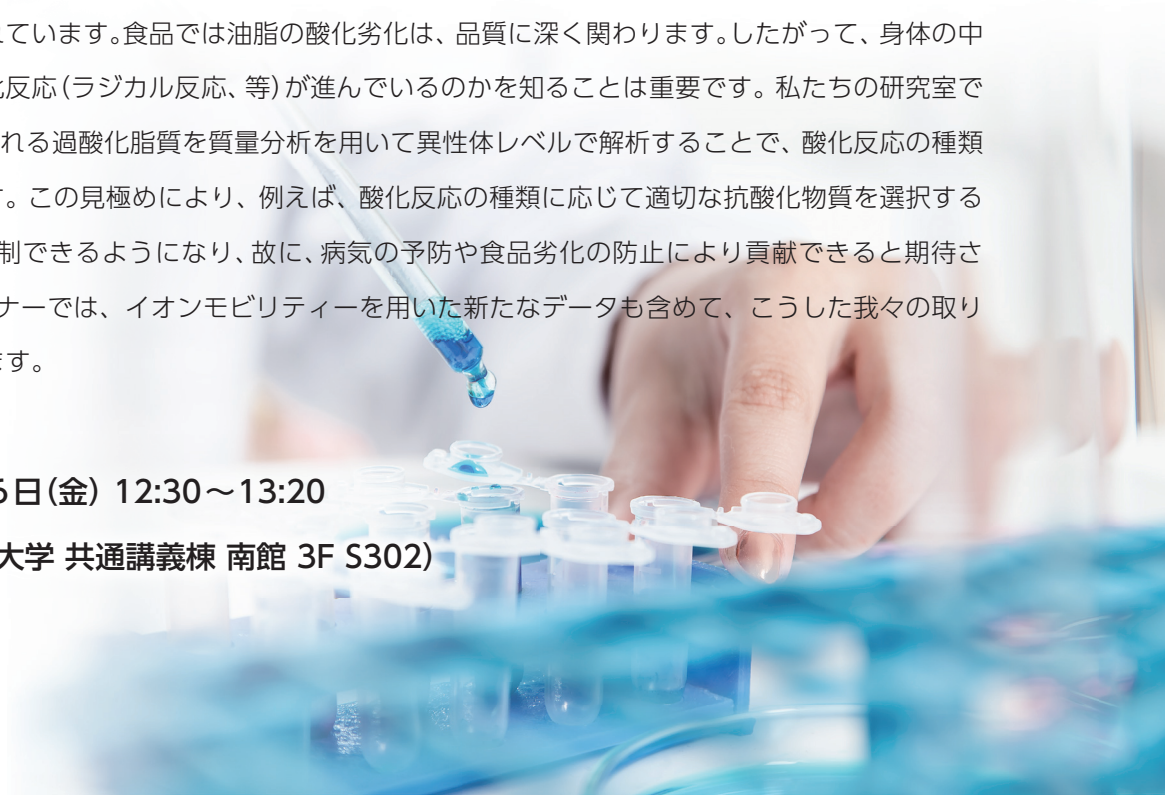


過酸化脂質(脂質ヒドロペルオキシド)の質量分析

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野 教授
仲川 清隆 先生

[講演要旨]

私たちの身体を構成する脂質が何らかの原因で酸化され、過酸化脂質(脂質ヒドロペルオキシド)が生じると、病気の要因になると考えられています。食品では油脂の酸化劣化は、品質に深く関わります。したがって、身体の中や食品中でどのような酸化反応(ラジカル反応、等)が進んでいるのかを知ることは重要です。私たちの研究室では、生体や食品試料に含まれる過酸化脂質を質量分析を用いて異性体レベルで解析することで、酸化反応の種類を見極めようとしています。この見極めにより、例えば、酸化反応の種類に応じて適切な抗酸化物質を選択することで、効果的に酸化を抑制できるようになり、故に、病気の予防や食品劣化の防止により貢献できると期待されます。本ランチョンセミナーでは、イオンモビリティーを用いた新たなデータも含めて、こうした我々の取り組みを紹介したいと思います。



日時 2018年3月16日(金) 12:30～13:20

会場 B08会場 (名城大学 共通講義棟 南館 3F S302)

プログラムNo.：LS1-6
司会：建田 潮 (SCIEX)

SCIEX 株式会社エービー・サイエックス
本社：〒140-0001 東京都品川区北品川 4-7-35 御殿山トラストタワー 21F
TEL：0120(318)551 FAX：0120(318)040
大阪：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎 3-19-3 ピアスタワー 3F
www.sciex.jp Email : jp_sales@sciex.com

MKT07-650A

「腸内細菌の捧げ物」

～ポストバイオティクス®が拓く未来～



日本農芸化学会2018年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナー LS2-1

座長 京都大学大学院農学研究科 教授
小川 順 先生

講師 北里大学 北里生命科学研究所 講師
松井 英則 先生
「乳酸菌が生産する不飽和脂肪酸の抗ヘリコバクター属活性」

日時
2018年3月17日(土)
12:30～13:20

会場
A20 会場

音楽の父J.S.バッハの名作に「音楽の捧げ物」という楽曲があります。この曲は、バッハが時のプロイセン国王フリードリヒ大王から与えられた（と言われている）ハ短調のごく短いテーマをもとに、巧みに変化を加えた主題をポリフォニックに配置し構築した、極めて複雑な作品です。譜面上は、難解な数学の問題の様な曲ですが、耳に入る音楽は、独特の広がりと、えも言えない一体感という、相反する要素が同居しつつも、極めて特異なバランスによりもたらされる美の伽藍となっています。筆者は、この名曲を聴くにつれ、目下の腸内細菌研究に思いを重ねます。

私たちは、あるひとつの腸内細菌脂質代謝物を主題とした、複雑で難解な「食・腸内細菌・宿主相関」を目の当たりにし、一種驚愕に近い思いを感じるとともに、その調和がもたらす健康という美に感嘆せざるを得ません。

その美の一端、すなわち、腸内細菌代謝物【ポストバイオティクス】の巧みで見事な生理機能発現、にまつわるお話をとおして、「腸内細菌の捧げ物」に思いをはせていただければ、と思います。

NOSTER
Postbiotics® to benefit everybody.

日東薬品工業株式会社

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO

日本農芸化学会2018年度大会

ランチョンセミナー LS2-2

記憶が形づくる香りの知覚

～ヒトの脳からみた食品研究

日 時 2018年3月17日(土) 12時30分～13時20分

会 場 B04 名城大学 共通講義棟 南館2F S201



演 者

岡本 雅子 先生

東京大学大学院農学研究科/
ERATO東原化学感覚
シグナルプロジェクト特任准教授



どのような食品をおいしく感じるかが、文化や経験の影響を受けることは、周知の通りである。つまり、おいしさは、末梢からの感覚入力だけでなく、脳に保存された記憶の影響も受けて変化する。特に嗅覚については、経験によって、香りに対する好き嫌いだけではなく、香りから感じる質感までが変化することが知られている。

本セミナーでは、食品のおいしさに重要な役割を果たす香りを中心に、記憶が食品の評価にどのような影響を与えるかを紹介する。さらにヒトの脳波計測のデータを基に、記憶が感覚処理に影響を及ぼす脳でのメカニズムについても紹介したい。

共催：味の素株式会社

日本農芸化学会２０１８年度大会ランチョンセミナー

実践！
定量ウェスタンブロッティング

定量性の高いウェスタンデータの取得とより正確なデータ補正

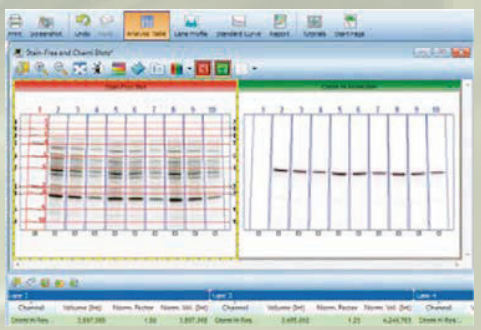
日時：3 月 17 日（土）　12:30 ～ 13:20
場所：S202（共通講義棟 南館 2F）

ウェスタンブロッティングは 30 年以上に渡りタンパク質定量（半定量）の手法として用いられていますが、タンパク質の相対的発現量の定量性については依然として議論されています。
また、ウェスタンブロッティングにおける定量性の確保は、正確な操作を含め、非常に難しいものとなっているのが現状です。

本セミナーでは、サンプル調整からデータ解析まで、定量性と再現性の高い結果を得るための注意点、ならびにそれらを踏まえた実験 Tips を紹介いたします。

検出部分ではケミルミ検出での注意点、Tips の紹介とともに、より定量性に優れた蛍光ウェスタンのご紹介、またデータ解析では最近主流になりつつある Stain-Free 技術を用いた総タンパク補正の方法について解説するとともにソフトウェアを用いて実際にどのように定量、補正の作業を行うかご紹介いたします。

演者：中田 宣之
（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）



BIO-RAD

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
http://www.bio-rad.com

Z11523L 1801a

日本農芸化学会2018年度大会　ランチョンセミナー　No.LS2-4

天然物化学の研究過程で得た独自技術の紹介

～高性能HPLC担体，高純度試薬の開発，UVエンド吸収によるHPLC分析，LC/MS/MS，NMR分析の工夫～

長良サイエンス株式会社　中塚 進一，松本 恵実，中塚 宏志

日時：3月17日（土）12:30～13:20

会場：B06会場（名城大学 共通講義棟 南館2F S203）

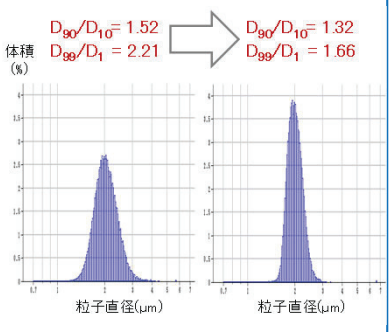
大学で開発した天然物化学の高度な技術を社会に生かし、卒業生に就職先を提供する目的で、1999年に岐阜大学の近くに当社を設立した。現在約450種類の高純度試薬を製造し、最近では受託業務（精製、構造決定、合成、研究）へと発展している。 本セミナーでは、弊社の独自技術と現状を紹介します。

① 天然物等の分析・分取でよく用いられるHPLC等。その充填カラムの担体を粒揃えして低圧力で高分離能なHPLC担体を作成し、充填して独自の高性能充填カラムの製法を確立した。

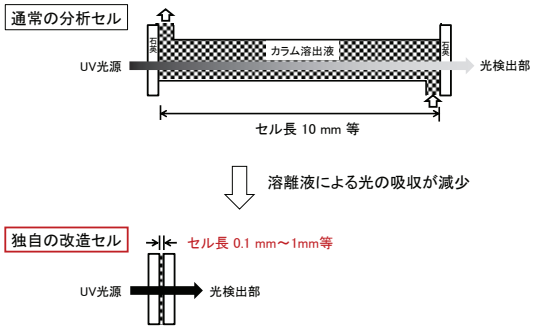
② 特徴的なUV吸収を持たない脂質や糖質等でもHPLC-UV検出器で分析できる独自の方法を開発した。安価で正確かつ汎用的なHPLC分析・分取法について紹介します。

③ 天然には極微量ながら強い薬理活性を示す化合物が数多く存在し、その構造は複雑で不安定であることが多い。それらに対してLC/MS/MSとNMR等を有効活用し、目的物を迅速に同定・単離する方法と最近の取り組みについて紹介します。

2μm シリカゲルの精密分級



UV検出器フローセル模式図



分析機器の活用



岐阜大学発バイオ企業

長良サイエンス株式会社

高純度試薬、受託業務（精製・合成・分析等）

〒501-1121岐阜県岐阜市古市場840　TEL: 058-234-4257

E-mail: nagara@nsgifu.jp　http://www.nsgifu.jp



日本農芸化学会 2018 年度大会

日時：3 月 17 日（土）12 時 30 分～13 時 20 分

会場：名城大学 共通講義棟 南館 3F S301　LS2-5

「新規機能性食品としての卵殻膜の腸炎抑制作用とマルチオミクス解析」

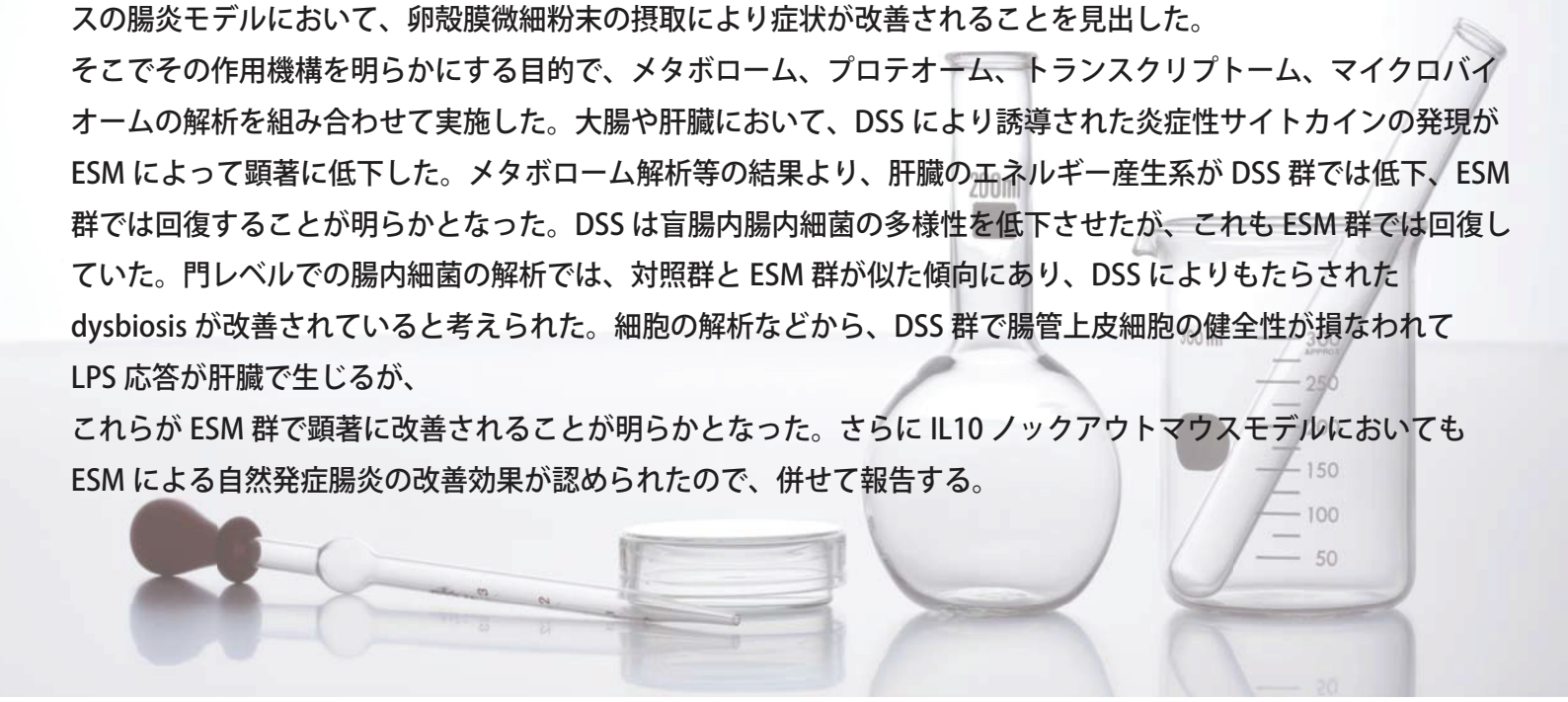
座長　東北大学大学院農学研究科　教授　宮澤陽夫先生

演者　東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授 加藤久典先生

鶏卵の卵殻膜（Egg Shell Membrane, ESM）は、通常家庭ゴミや産業廃棄物として処理される。近年卵殻膜粉末や加水分解物に関して、いくつかの健康機能が報告されている。今回デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）投与マウスの腸炎モデルにおいて、卵殻膜微細粉末の摂取により症状が改善されることを見出した。

そこでその作用機構を明らかにする目的で、メタボローム、プロテオーム、トランスクリプトーム、マイクロバイオームの解析を組み合わせて実施した。大腸や肝臓において、DSS により誘導された炎症性サイトカインの発現が ESM によって顕著に低下した。メタボローム解析等の結果より、肝臓のエネルギー産生系が DSS 群では低下、ESM 群では回復することが明らかとなった。DSS は盲腸内腸内細菌の多様性を低下させたが、これも ESM 群では回復していた。門レベルでの腸内細菌の解析では、対照群と ESM 群が似た傾向にあり、DSS によりもたらされた dysbiosis が改善されていると考えられた。細胞の解析などから、DSS 群で腸管上皮細胞の健全性が損なわれて LPS 応答が肝臓で生じるが、

これらが ESM 群で顕著に改善されることが明らかとなった。さらに IL10 ノックアウトマウスモデルにおいても ESM による自然発症腸炎の改善効果が認められたので、併せて報告する。



SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2018年度大会

ランチョンセミナーのご案内

LS2-6 島津製作所の最新分析ソリューションのご紹介

日時 2018年3月17日(土) 12:30～13:20

会場 B08会場(名城大学 共通講義棟 南館3F S302)

講演1 **食品分野におけるLC/MS/MSメソッドパッケージの分析例**

中西　豪 (株式会社島津製作所)

本セミナーでは①食品衛生上、問題となるかび毒(Mycotoxin)、②飼料に添加されることで畜産食品への残留が懸念されるアミノグリコシド系抗生物質、③腸内細菌叢との関連が高い短鎖脂肪酸 をそれぞれ対象とする3つのメソッドパッケージをその分析例とともにご紹介いたします。

講演2 **細胞培地分析プラットフォーム:C2MAPシステムのご紹介**

豊田　健一 (株式会社島津製作所)

C2MAPシステムは培地の前処理からLC/MS/MSによる多成分一斉分析・分析データのグラフ化までをサポートする新たな培地分析プラットフォームです。本セミナーではC2MAPシステムを分析例とともにご紹介いたします。

司会:渡邉　淳 (株式会社島津製作所)

お問合せ
(株)島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1　TEL:075-823-1352

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2018 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会　2018 年 度 大 会 講 演 要 旨 集　（オンライン）
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2018 Nagoya of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2018 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2018　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/
162-0808 東京都新宿区天神町 78　　Phone 03-3260-5211